

Université de Sherbrooke

Étude des mécanismes de signalisation du récepteur à l'angiotensine II de type 2

Par
Alexandre Connolly
Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2019

Membres du jury d'évaluation
Pr Richard Leduc, programme de pharmacologie
Pr Jean-Patrice Baillargeon, programme de pharmacologie
Pr Jean-Luc Parent, programme de pharmacologie
Pr Fernand-Pierre Gendron, programme de biologie cellulaire

© Alexandre Connolly, 2019

RÉSUMÉ

Étude des mécanismes de signalisation du récepteur à l'angiotensine II de type 2

Par

Alexandre Connolly

Programme de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

À eux seuls, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) forment la plus grande famille de récepteurs et sont la cible du tiers de tous les médicaments approuvés par la FDA. Les mécanismes de signalisation du récepteur de l'angiotensine II de type 2 (AT₂), un récepteur à sept domaines transmembranaires, n'ont pas encore été clairement et complètement définis. Dans la présente contribution, nous avons cherché à identifier les déterminants moléculaires impliqués dans l'activation de l'AT₂. Le positionnement atypique de l'hélice 8, dans la structure d'AT₂ récemment publiée, peut jouer un rôle dans la capacité du récepteur à se coupler aux effecteurs en aval. En effet, chez AT₂, l'hélice 8 pointe vers l'intérieur du récepteur tandis que dans la plupart des GPCR de classe A l'hélice 8 est engagée dans des interactions tertiaires avec la boucle intracellulaire 1 (ICL1) et à distance du site de liaison de l'effecteur. Après un examen plus approfondi de la structure d'AT₂, nous avons constaté que les résidus contenus dans l'ICL1 pouvaient être impliqués dans la formation de cette conformation inhabituelle de l'hélice 8. Pour explorer cette hypothèse, nous avons conçu une série de chimères des récepteurs AT₁ / AT₂ afin de valider les rôles de ICL1 et de l'hélice 8 dans la signalisation d'AT₂. La substitution de l'ICL1 entre AT₁ et AT₂ a mené à une perte de signalisation dans le récepteur AT₁ chimérique et un gain de signalisation avec le récepteur AT₂ chimérique. La substitution des domaines hélicoïde 8 et C-terminale entre AT₁ et AT₂ a, quant à elle, conduit à un récepteur AT₁ chimérique conservant la majeure partie de ses propriétés de signalisation. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale d'AT₂ est compatible avec la signalisation canonique des GPCR de classe A et que l'ICL1 d'AT₂ est impliqué dans le repositionnement de l'hélice 8, ce qui entrave l'engagement des effecteurs classiques des GPCR tels que les protéines G ou les arrestines.

De plus, nous avons aussi comme objectif d'identifier les événements de phosphorylation modulés par le récepteur AT₂ et ainsi obtenir une compréhension plus large de ses mécanismes de signalisation. Nous avons donc quantifié les changements induits au phosphoprotéome cellulaire à la suite d'une stimulation du récepteur AT₂ à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse. Avec ces travaux, il a été possible d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la signalisation d'AT₂ et potentiellement d'élargir ses applications thérapeutiques.

Mots clés : AT₂, angiotensine, récepteurs couplés aux protéines G, récepteur chimérique, phosphoprotéome

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	ii
Table des matières	iii
Liste des figures.....	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
Introduction.....	9
1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)	9
1.1.1 Structure des GPCR de classe A.....	10
1.1.2 Activation des GPCR.....	10
1.1.3 Transduction du signal des GPCR.....	13
1.2 Le système rénine-angiotensine	16
1.2.1 Rôles physiologiques de l'angiotensine II	17
1.3 Les récepteurs angiotensinergiques	18
1.3.1 Le récepteur AT ₁	19
1.3.2 Le récepteur AT ₂	20
1.3.2.1 Expression et régulation du récepteur AT ₂	21
1.3.2.2 Structure du récepteur AT ₂	21
1.3.2.3 Signalisation du récepteur AT ₂	24
Hypothèse de recherche.....	27
Article.....	28
Matériel et méthodes (hors article)	58
4.1 Modification du protocole pour les essais de BRET	58
4.1.1 Mesure de l'évolution dans le temps de l'activation des voies dépendantes des protéines G par BRET.....	58
4.2 Induction de l'élongation des neurites dans les cellules NG108-15 par une stimulation du récepteur AT₂.....	58
4.3 Analyse du phosphoprotéome	59
4.3.1 Préparation des échantillons.	59
4.3.2 Analyses phosphoprotéomiques des échantillons	59
Résultats (hors article).....	61
5.1 Activation des protéines G par le récepteur AT₂	61
5.1.1 Activation de la voie G _q	61

5.1.2 Activation des voies $G_{12/13}$	62
5.1.3 Activation des voies de la famille G_i	63
5.2 Modulation des niveaux d'AMPc par les récepteurs angiotensinergiques et leurs chimères.....	66
5.3 Différenciation des cellules NG108-15 induite par le récepteur AT_2	69
5.4 Analyse des effets d'AT_2 sur le phosphoprotéome	71
Discussion.....	73
6.1 Caractérisation de la signalisation du récepteur AT_2.....	73
6.1.1 Le récepteur AT_2 et la signalisation ligand-dépendante.....	73
6.1.2 Le récepteur AT_2 et la signalisation ligand-indépendante.....	74
6.2 Les déterminants structuraux importants et leurs implications dans la signalisation d'AT_2.....	75
6.2.1 Implication de la première boucle intracellulaire d' AT_2	75
6.2.2 Rôle et implication de l'hélice 8 d' AT_2	76
6.3 AT_2 et les effets de sa stimulation sur le phosphoprotéome cellulaire et son potentiel comme cible thérapeutique.	78
Conclusions et perspectives.....	81
Liste des références	82

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Représentation schématique des 3 classes de GPCR chez l'humain.....	9
Figure 2. Un aperçu de la signalisation des GPCR.....	14
Figure 3. Conformation active d'AT ₂	23
Figure 4. Un aperçu de la signalisation d'AT ₂	25

Article

Figure 1. Tri-dimensional structures of the resting state of AT ₁ R and AT ₂ R.....	38
Figure 2. Activation of G protein and β -arrestin signalling pathways with increasing concentration of AngII for wild type receptors.....	41
Figure 3. Activation of G protein and β -arrestin signaling pathways with increasing concentration of AngII for the first intracellular loop chimeric receptors	43
Figure 4. Activation of G protein and β -arrestin signaling pathways with increasing concentration of AngII for the C-tail chimeric receptors.....	46
Figure 5. Second messenger production with increasing concentration of AngII	48

Résultats

Figure 5. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G _q	62
Figure 6. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G ₁₂ et G ₁₃	63
Figure 7. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G _{i1/2/3}	64
Figure 8. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G _z , G _{oA} et G _{oB}	65
Figure 9. Évolution dans le temps de la production d'AMPc	68
Figure 10. Effet de l'AngII et du C21 sur l'élongation des neurites.....	70
Figure 11. Analyse du phosphoprotéome	72

LISTE DES TABLEAUX

Article

Table 1. Binding properties of AT ₁ R, AT ₂ R and chimeric receptors	39
Table 2. Activation of G _q , G _{i2} , G ₁₂ , βarr1 and βarr2 by AT ₁ R, AT ₂ R and ICL1 chimeric mutant receptors	44
Table 3. Activation of G _q , G _{i2} , G ₁₂ , βarr1 and βarr2 by AT ₁ R, AT ₂ R and C-term chimeric mutant receptors	47

Résultats

Tableau 1. Analyse du phosphoprotéome	72
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPe	Adénosine monophosphate 3', 5'-cyclique
AngII	Angiotensine II
AP-2	Adaptateur de clathrine 2
AT ₁	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
AT ₂	Récepteur à l'angiotensine II de type 2
ATIP	<i>AT₂ receptor interacting protein</i>
DAG	Diacylglycérol
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECL	Boucle extracellulaire
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanine
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G/ <i>G protein-coupled receptor</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GTP	Guanosine triphosphate
ICL	Boucle intracellulaire
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphate
Jak	<i>Janus kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMS2	Ubiquitin-conjugating enzyme variant MMS2
NO	Oxyde nitrique
OPRL1	<i>Opioid related nociceptin receptor 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protéines kinases A
PKC	Protéines kinases C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C

RAS	<i>Renin–angiotensin system</i>
RhoGEF	<i>Guanine exchange factors for Rho proteins</i>
TM	<i>Domaine transmembranaire</i>
TP α	<i>α isoform of the thromboxane A₂ receptor</i>
TrkA	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i>

INTRODUCTION

1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Les cellules possèdent divers outils leur permettant de recevoir de l'information provenant de leurs milieux extracellulaires. L'un des champs d'intérêt de la pharmacologie est le rôle et le fonctionnement des récepteurs transmembranaires, et ce, en raison de leurs potentiels thérapeutiques. À eux seuls, les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) forment la plus grande famille de récepteurs et sont la cible du tiers de tous les médicaments approuvés par la FDA (Fredriksson et Schiöth, 2005; Hauser *et al.*, 2017). Souvent considéré comme une super famille, les GPCR sont divisés en 7 sous-familles : A, B, C, D, E, F et les GPCR d'adhésion (Jacoby *et al.*, 2006). Chez l'humain, les GPCR se classent en 3 grandes familles (Figure 1). La première, la classe A, regroupe les GPCR similaires à la rhodopsine, associés à plusieurs fonctions telles que l'odorat, la vision, la production d'hormones et la neurotransmission. La deuxième, la classe B, est formée des GPCR similaires au récepteur de la sécrétine tandis que la classe C est formée des GPCR similaires au récepteur du glutamate (Fredriksson et Schiöth, 2005). Malgré la grande variété de GPCR, ils ont tous une structure semblable : 7 domaines transmembranaires (TM) avec une structure secondaire d'hélice α , ainsi que 3 boucles extracellulaires (ECL1-3) et 3 boucles intracellulaires (ICL1-3) reliant chacun des TM au suivant. Toutefois, les différentes familles de GPCR se distinguent entre elles surtout par leurs extrémités N-terminale (extracellulaire) et C-terminale (intracellulaire) (Kobilka, 2007).

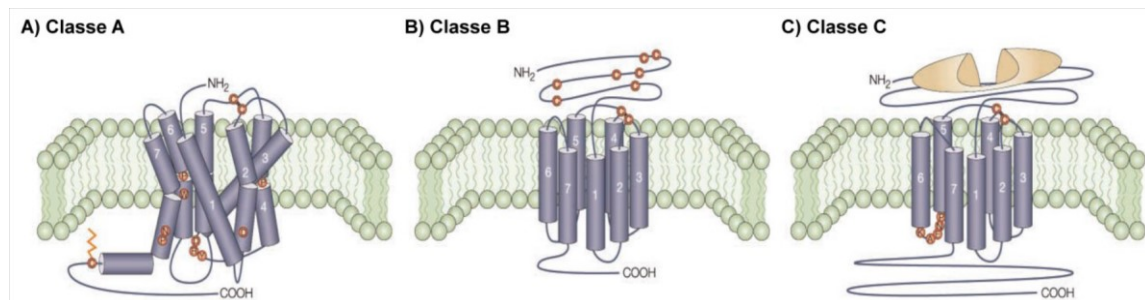


Figure 1. Représentation schématique des 3 classes de GPCR chez l'humain.

La classe A (A), la classe B (B), la classe C (C). Figure adaptée de (George *et al.*, 2002)

1.1.1 Structure des GPCR de classe A

Les récepteurs de la classe A forment la plus grande famille de GPCR et possèdent diverses caractéristiques qui leur sont propres. Aussi appelés « *Rhodopsin-like* » en raison de leur homologie avec la structure de la rhodopsine, les GPCR formant cette classe sont les plus étudiés. La rhodopsine, responsable de la sensibilité aux photons des yeux, fut le premier GPCR à être cloné en 1983, ainsi que le premier GPCR dont la structure a été cristallisée en 2000 (McBee *et al.*, 2001; Palczewski *et al.*, 2000).

De plus, c'est dans les domaines transmembranaires qu'il est possible de voir la plus forte homologie de séquence entre des différents récepteurs de classe A, une homologie allant de 30 à 100% (Cvicek *et al.*, 2016). Il est aussi possible d'y trouver la présence de plusieurs résidus et motifs conservés ayant une importance toute particulière dans les mécanismes d'activation des GPCR de cette classe. La majorité des GPCR de classe A possèdent un pont disulfure entre le TM3 et l'ECL2 qui aide au maintien de l'intégrité du récepteur. Un autre trait des GPCR de cette classe est la présence d'une 8^e hélice au tout début de la queue C-terminale. Chez certains GPCR de classe A, comme la rhodopsine, cette structure (aussi simplement appelé l'hélice 8) possède une cystéine pouvant être palmitoylée permettant son ancrage à la membrane plasmique (Ovchinnikov *et al.*, 1988). Les GPCR de classe A possèdent aussi d'autres sites pouvant accueillir des modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. La glycosylation des GPCR a été démontrée comme pouvant être requise pour assurer le bon repliement, la stabilité et l'expression du récepteur en plus de pouvoir influencer l'affinité d'un ligand pour son récepteur, comme dans le cas du récepteur β_2 -adrénergique ou du récepteur de angiotensine II de type 1 (AT₁) (Lancot *et al.*, 2005; Wheatley et Hawtin, 1999).

1.1.2 Activation des GPCR

L'activation des GPCR est un processus relativement simple en surface : la liaison d'un ligand, agissant comme agoniste au récepteur, stabilisant une conformation active de ce dernier et lui permettant d'activer à son tour des protéines effectrices intracellulaires menant à une réponse de la cellule (Weis et Kobilka, 2018). Cependant, les mécanismes moléculaires et les diverses subtilités derrière l'activation des GPCR peuvent s'avérer être relativement

complexes. Lorsque le récepteur est activé, via la liaison d'un agoniste par exemple, une série de réarrangements conformationnels s'opèrent au niveau du récepteur, favorisant le recrutement et l'activation de l'hétérotrimère de protéines G inactives (Higashijima *et al.*, 1987; Hilger *et al.*, 2018). En ce sens, la publication des structures tertiaires de divers GPCR, a permis d'identifier divers motifs dont la séquence est fortement conservée chez les GPCR de classe A et leurs implications dans la transition entre différents états fonctionnels.

Le motif DR^(3.50)Y, situé à la base du TM3 et adjacent aux TM5 et TM6, est l'un des plus étudiés. En effet, l'un des changements conformationnels les plus importants lors de l'activation du récepteur est le déplacement du TM6 vers l'extérieur permettant la création/l'ouverture d'une pochette pour la liaison des protéines G. Dans les GPCR inactifs de classe A, ce mouvement du TM6 est empêché par la présence d'un pont salin entre l'acide glutamique du TM6 et l'arginine du motif DR^(3.50)Y. Aussi connu sous le nom « *Ionic lock* », cette interaction a comme effet de stabiliser la forme inactive du récepteur et doit être brisée, par la rotation de l'Arg^(3.50), pour permettre l'activation (Rosenbaum *et al.*, 2009; Weis et Kobilka, 2018).

Un autre motif important dans l'activation des GPCR est le motif NP^{7.50}xxY. Présent dans le bas du TM7, situé juste avant la queue C-terminale, le motif NP^{7.50}xxY participe aussi à la formation du site de liaison des protéines G. En effet, lors de l'activation du GPCR, il y a déplacement et rotation du TM7 vers l'intérieur du récepteur en direction d'où se trouvait le TM6 en position inactive. Ce mouvement vers l'intérieur stabilise la conformation active du récepteur en empêchant le retour du TM6. Ce mouvement du coude à la fin du TM7, principalement de la tyrosine^{7.53}, joue le rôle d'un interrupteur et est aussi connu sous le nom de « *tyrosine toggle switch* » (Rosenbaum *et al.*, 2009; Weis et Kobilka, 2018).

Un autre motif important à souligner présent dans les GPCR de classe A est le motif P^{5.50}-I-F. Ce motif, formant une interface entre les TM3, TM5 et TM6, est situé à proximité de la base de la pochette de liaison du ligand. Dans les GPCR actifs, il y a un réarrangement conformationnel des résidus composant PIF, induisant un mouvement du TM5 (surtout au

niveau extracellulaire) vers l'intérieur et participent au mouvement du TM6 vers l'extérieur du récepteur du côté cytoplasmique (H. Zhang *et al.*, 2017).

Tous ces motifs subissent un réarrangement conformationnel important au moment de l'activation du GPCR et nous aident, lors de l'analyse d'une nouvelle structure de GPCR, à déterminer si ce dernier est potentiellement actif ou inactif dans une conformation donnée. Il est aussi important de se rappeler que les GPCR, comme les autres molécules et protéines, sont constamment en mouvement rapide (de l'ordre de la femto- à la nanoseconde) à l'échelle atomique, et ce, même en absence de ligand ou d'autres stimulus (Henzler-Wildman et Kern, 2007; Latorraca *et al.*, 2017). Ces petits mouvements permettent aux GPCR de prendre un nombre pratiquement infini de conformations : une conformation étant l'arrangement tridimensionnel précis du récepteur à un instant précis. En revanche, les mouvements de plus grande amplitude, comme la rotation d'une hélice, sont beaucoup plus lents (de l'ordre de la nano- à la milliseconde). Les différentes conformations qu'adoptent un récepteur ne sont pas distribuées de façon aléatoire : elles auront tendance à se répartir en groupes de conformations similaires formant ce que l'on appelle des états conformationnels. Il est aussi important de souligner que la quantité d'énergie requise pour passer d'un état conformationnel à un autre (aussi appelé barrière énergétique) est beaucoup plus grande comparativement à celle nécessaire pour passer d'une conformation à une autre. Un GPCR adopte donc beaucoup de conformations différentes par de petits changements rapides nécessitant peu d'énergie; les états conformationnels, des groupes de conformations similaires, nécessitent plus de temps et d'énergie pour effectuer les changements nécessaires au passage d'un état conformationnel à un autre (Deupi et Kobilka, 2007; Hilger *et al.*, 2018; Latorraca *et al.*, 2017; Weis et Kobilka, 2018).

Lors de la liaison d'un agoniste au récepteur, il s'en suit des changements dans la conformation de celui-ci qui favoriseront son état actif, par exemple en facilitant le bris de l'« *Ionic lock* ». Autrement dit, le GPCR passera plus de temps dans un état (également appelé population de l'état) actif comparativement à sa forme inactive à la suite de la liaison d'un agoniste. Cependant, des études utilisant de la cristallographie, de la spectroscopie et des simulations de dynamiques moléculaires ont permis de mettre en évidence que les GPCR

existent sous différents états conformationnels intermédiaires stables. En effet, les GPCR ne se retrouvent pas seulement dans une conformation active ou inactive, mais adoptent une série de conformations dynamiques variant rapidement entre une conformation active ou inactive. De plus, la plupart des GPCR possèdent une activité basale, indiquant que même en absence d'agoniste, une certaine population des récepteurs peut être dans un état actif (Weis et Kobilka, 2018). Toutefois, l'équilibre entre la population active et inactive ne dépend pas seulement de la liaison d'un agoniste. Le fait d'introduire une mutation peut permettre l'activation du récepteur sans l'utilisation de ligand. Par exemple, dans le cas du récepteur β_2 -adrénergique, la mutation L272^{6.34}A a pour effet d'augmenter son activité basale (Gether *et al.*, 1997), alors que la mutation N111^{3.35}G, pour le récepteur AT₁, induit elle aussi une activité constitutive du récepteur (Cabana *et al.*, 2013).

1.1.3 Transduction du signal des GPCR

Le rôle classique des GPCR est de faire le lien entre la liaison d'un agoniste et l'activation des protéines G hétérotrimériques spécifiques, menant ultimement à la modulation des protéines effectrices de la cellule (Rosenbaum *et al.*, 2009). L'activation des GPCR initie diverses cascades de signalisation qui peuvent être dépendante des protéines G ou indépendante de celles-ci. De plus, la phosphorylation des GPCR par les kinases de GPCR (GRK) permet le recrutement et le couplage des β -arrestines (Hilger *et al.*, 2018).

C'est en 1971 que Martin Rodbell a émis, pour la première fois, l'idée que les récepteurs pourraient être associés à une protéine régulatrice guanine-nucléotide et qui aurait le rôle de relier le récepteur aux effecteurs cellulaires (Rodbell *et al.*, 1971). Il a plus particulièrement été montré que la stimulation des cellules par le glucagon menait à une production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Initialement nommée Ns, cette protéine est maintenant connue sous le nom Gs et fut démontrée comme étant un hétérotrimère suite à sa purification (Pierce *et al.*, 2002). Les protéines G hétérotrimériques sont composées des 3 sous-unités G α , G β et G γ . La sous-unité régulatrice α est couplée à une molécule de guanosine diphosphate (GDP) favorisant le maintien de l'hétérotrimère sous sa forme inactive et empêchant sa dissociation. Au moment de l'activation, le GPCR prend un rôle de facteur d'échange de guanine (GEF) et permet la substitution de la molécule de GDP

de la sous-unité $G\alpha$ pour une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Cette liaison du GTP à la sous-unité $G\alpha$ engendre un changement conformationnel au sein de l'hétérotrimère et permet à la sous-unité $G\alpha$ de se dissocier du complexe $G\beta\gamma$. Sous ces formes, les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ peuvent maintenant activer les protéines effectrices leur étant associées (Figure 2) (Deupi et Kobilka, 2007; Hilger *et al.*, 2018; Pierce *et al.*, 2002; Weis et Kobilka, 2018).

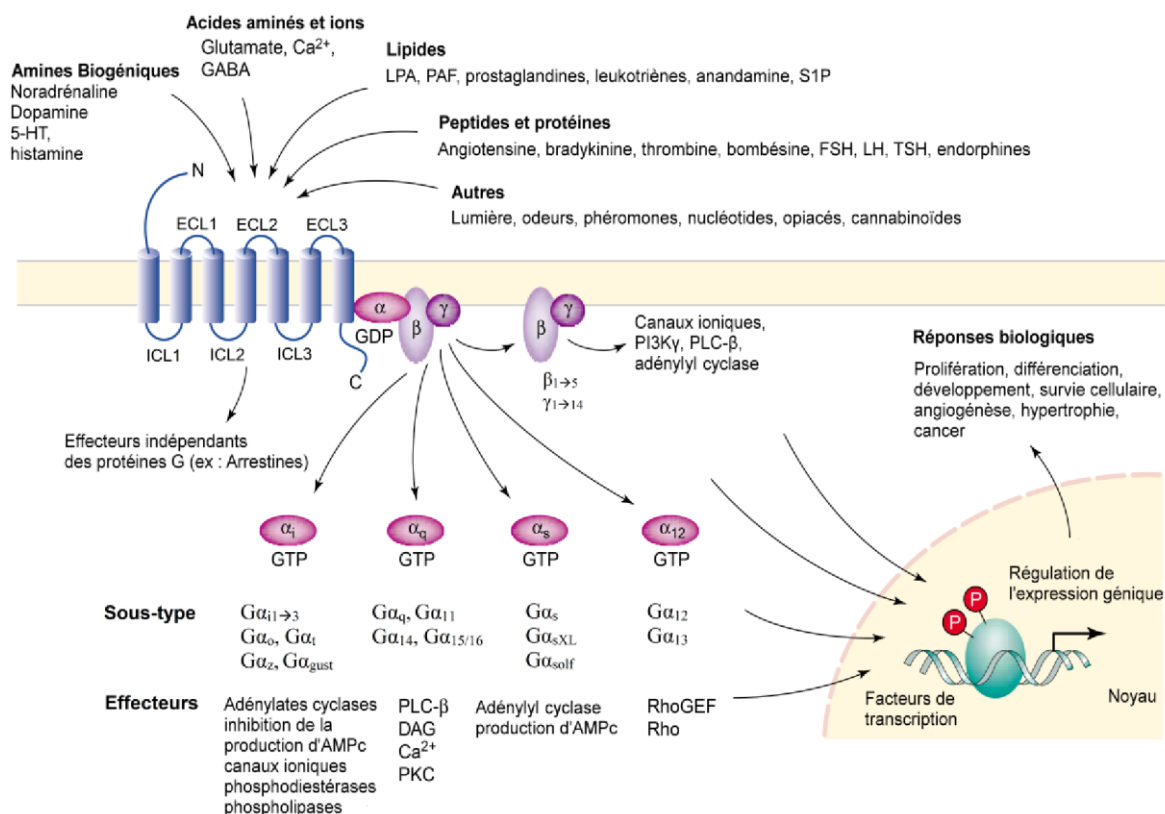


Figure 2. Un aperçu de la signalisation des GPCR.

Représentation de différents types de ligands capables d'activer les GPCR, et des différentes voies de signalisation pouvant résulter de l'activation des GPCR. Figure adaptée de (Dorsam et Gutkind, 2007; Marinissen et Gutkind, 2001).

Chez l'humain, il existe 21 différentes isoformes de la protéine $G\alpha$ qui sont regroupées, selon leur homologie de séquence, en 4 familles : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12/13}$ (Downes et Gautam, 1999; Simon *et al.*, 1991). La famille $G\alpha_s$ stimule la production d'AMPc en activant les adénylates cyclases (Syrovatkina *et al.*, 2016). Cette hausse d'AMPc peut

mener à l'activation de protéines comme les protéines kinases A (PKA) (Wettschureck et Offermanns, 2005). Il est intéressant de noter que l'importance de l'AMPc fût initialement mise en valeur par Earl W. Sutherland, Jr. qui en 1971 s'est vu octroyer le prix Nobel de physiologie ou de médecine pour ses découvertes concernant « les mécanismes de l'action des hormones ». La famille $G\alpha_{i/o}$, induit une inhibition des adénylates cyclases causant ainsi une baisse des niveaux d'AMPc (Syrovatkina *et al.*, 2016; Wettschureck et Offermanns, 2005). La famille $G\alpha_{q/11}$, quant à elle, active la phospholipase C ($PLC\beta$) qui hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) (Syrovatkina *et al.*, 2016). Le DAG est nécessaire à l'activation de certaines protéines kinases C (PKC) et l' IP_3 induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Rhee et Bae, 1997). Quant à la famille $G\alpha_{12/13}$, elle active directement les RhoGEF pour réguler l'activité de la GTPase Rho en plus d'être impliquée dans le remodelage du cytosquelette (Suzuki *et al.*, 2009).

En plus des protéines $G\alpha$, les protéines $G\beta\gamma$ participent aussi à la signalisation découlant des GPCR. Chez l'humain, il existe 5 isoformes de la sous-unité $G\beta$ (β_{1-5}) et 12 isoformes pour la sous-unité $G\gamma$ ($\gamma_{1-5, 7-13}$) (Hurowitz *et al.*, 2000). Les $G\beta\gamma$ peuvent moduler plusieurs effecteurs comme des canaux potassiques et calciques, les GRK, les $PLC\beta$ (ainsi que $PLC\epsilon$ et $PLC\eta$), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), les *mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) et des adénylates cyclases (Khan *et al.*, 2013). De plus, la littérature suggère que tous les couples $G\beta_x\gamma_x$ ne sont pas équivalents et ont des activités distinctes en fonction des isoformes formants les dimères (Dupré *et al.*, 2008).

La phosphorylation des régions intracellulaires des GPCR par les GRK joue un rôle essentiel dans la signalisation et la régulation du récepteur. En effet, la phosphorylation des portions intracellulaires des GPCR par les GRK est généralement requise pour le recrutement et pour la liaison des β -arrestines. Toutefois, contrairement aux GPCR, il existe seulement 7 GRK et seulement les isoformes 2, 3, 5 et 6 sont exprimées dans l'ensemble de l'organisme (Nobles *et al.*, 2011). Les différentes GRK semblent aussi être impliquées dans diverses cascades signalétiques. Par exemple, dans le cas de la phosphorylation agoniste dépendante du récepteur, la désensibilisation et le recrutement de β -arrestines seraient médiés par GRK2

et GRK3, tandis que GRK5 et GRK6 seraient quant à eux seraient importants pour l'activation, β -arrestines dépendante, de ERK (Ren *et al.*, 2005).

Il existe 4 arrestines chez les mammifères. L'arrestine1 et l'arrestine4 sont uniquement exprimées au niveau de la rétine; l'arrestine2 (β -arrestine1) et l'arrestine3 (β -arrestine2) sont exprimées de façon ubiquitaire et sont capable de se s'associer à la majorité des GPCR (Shenoy et Lefkowitz, 2005). Les β -arrestines sont d'une grande importance pour la régulation et la signalisation des GPCR. L'un des premiers rôles attribués aux β -arrestines fut la perte progressive de réponse des récepteurs à la suite de stimulations répétées par leur agoniste. Ce phénomène, aussi connu sous le nom de désensibilisation, prend place en deux étapes : le récepteur activé est phosphorylé par les GRK et le couplage des β -arrestines aux GPCR mène à l'inhibition de la signalisation dépendante de la protéine G (Shenoy et Lefkowitz, 2005). Les β -arrestines sont aussi un chaînon important pour l'internalisation des récepteurs : elles favorisent le rapprochement entre les récepteurs et les puits recouverts de clathrine (CCP) en se liant au complexe de clathrine et à l'adaptateur de clathrine 2 (AP-2) (Fessart *et al.*, 2005). Les β -arrestines servent aussi de protéines d'échafaudage multifonctionnelles, faisant le lien entre les GPCR et plusieurs voies de signalisation comme l'activation de PKB, des MAPK et de PI3K (Couzin, 2005; Lefkowitz et Shenoy, 2005).

La multitude des possibilités signalétiques des β -arrestines, bien que seulement 2 isoformes non-rétiniennes soient exprimées chez les mammifères, a mené à l'émergence du « *Barcode hypothesis* » par le groupe de Robert J. Lefkowitz. Ils ont émis l'hypothèse que les différents GRK pourraient phosphoryler de façon différentielle les domaines intracellulaires d'un GPCR, menant à la création d'un « code à barres » qui serait spécifique pour une conformation précise de la β -arrestines menant à une signalisation spécifique (Nobles *et al.*, 2011).

1.2 Le système rénine-angiotensine

C'est en 1898 que Tigerstedt et Bergman ont publié les premières observations selon lesquelles les extraits de rein produisaient des effets presseurs (Tigerstedt et Bergman, 1898). Il faudra toutefois attendre 1940 pour que la rénine soit isolée à partir de sang veineux rénal, d'où elle tire son nom. Une autre découverte importante des années 40 est celle de

l'angiotensinogène par Page et Helmer (Braun-Menendez *et al.*, 1940). L'angiotensine quant à elle fut découverte simultanément par un groupe des États-Unis et un autre de l'Argentine qui nommèrent le peptide angiotonine et hypertensine respectivement et ce n'est seulement qu'en 1958 qu'un consensus sera obtenu pour le nom final « angiotensine » (Bumpus *et al.*, 1957; de Gasparo *et al.*, 2000; Skeggs *et al.*, 1956).

Le système rénine-angiotensine (RAS) est composé d'un équilibre complexe entre plusieurs réactions enzymatiques et contient plusieurs molécules actives. Reconnu comme étant la plus importante, l'angiotensine II (AngII), est responsable de la majorité des effets physiologiques associés au système rénine-angiotensine (RAS) et a un rôle de premier plan dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire (Shin-ichiro Miura *et al.*, 2003). Bien connu pour son implication dans la modulation de la pression artérielle, l'AngII y participe plus d'une façon : elle agit à la fois sur le volume sanguin ainsi que sur la résistance vasculaire. Il est donc naturel que le RAS soit activé en réponse à une baisse du volume sanguin, mais il est aussi activé par une baisse des niveaux plasmatiques en sodium. L'apparition de ces activateurs stimule la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires du rein. Produit par le foie, l'angiotensinogène est alors clivé par la rénine présente en circulation et mène à la formation de l'angiotensine I. L'angiotensine I, un décapeptide (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) n'ayant pas de fonctions biologiques connues, est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), présent principalement au niveau de l'endothélium pulmonaire et rénal, en AngII. L'AngII est une hormone composée de huit acides aminés (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) et est l'agent actif principal du RAS (de Gasparo *et al.*, 2000).

1.2.1 Rôles physiologiques de l'angiotensine II

Le RAS classique est un système endocrinien complexe induisant, par l'entremise de l'AngII, des effets sur divers tissus comme les glandes surrénales, les reins, le cerveau, les muscles vasculaires lisses. Au niveau des glandes surrénales, l'AngII induit la sécrétion d'aldostérone qui augmente la réabsorption de sodium (Na^+), l'excrétion de potassium (K^+) et mène ultimement à une augmentation de la réabsorption d'eau au niveau des reins. L'AngII augmente aussi la soif par l'entremise d'une augmentation de l'activité du système nerveux

sympathique. Dans le cerveau, plus précisément au niveau de l'hypophyse, l'AngII stimule la sécrétion de vasopressine. Induisant une vasoconstriction artérielle et une réabsorption d'eau au niveau des tubules collecteurs du rein, la vasopressine permet d'augmenter la pression artérielle. Par ces mécanismes, l'AngII induit donc une augmentation de la pression par une augmentation du volume. De plus, il est important de noter que l'AngII peut aussi augmenter la pression par une hausse de la résistance périphérique en induisant une vasoconstriction au niveau des artérioles (Karnik *et al.*, 2015; Kaschina et Unger, 2003).

En plus d'être une hormone importante au niveau endocrinien, l'AngII peut également être produite localement dans certains tissus et y avoir un rôle d'hormone autocrine ou paracrine (Dzau et Gibbons, 1987). Fonctionnant de façon indépendante du RAS endocrinien, le RAS tissulaire est impliqué dans la régulation d'effets chroniques en réponse à l'AngII produite localement au niveau des tissus adipeux, du cerveau, des reins, du cœur ou des vaisseaux sanguins, par exemple. Le RAS tissulaire est impliqué dans plusieurs physiopathologies comme l'hypertrophie cardiaque et le diabète de type 2 où l'AngII manifeste certains de ses effets délétères (Karnik *et al.*, 2015; Mehta et Griendling, 2007).

1.3 Les récepteurs angiotensinergiques

L'angiotensine II médie ses effets chez l'homme par l'entremise de récepteurs transmembranaires, le plus connu étant le récepteur AT₁. Il aura fallu attendre les années 80 avant que soit démontrée pour la première fois l'existence d'un deuxième sous-type de récepteur angiotensinergique. Ce 2^e sous-type, le récepteur de l'angiotensine de type 2 (AT₂), a pu être découvert grâce au développement de nouveaux outils pharmacologiques : le PD123177 (antagoniste AT₂) et le DuP753 (antagoniste AT₁ aussi connu sous le nom de losartan). Chez l'humain, ces récepteurs sont présents sous la forme de gènes distincts : AGTR1 pour le récepteur AT₁ et AGTR2 pour le récepteur AT₂. Étant un joueur central dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire et du système RAS, le récepteur AT₁ est le mieux caractérisé dans cette famille (de Gasparo *et al.*, 2000; Karnik *et al.*, 2015).

1.3.1 Le récepteur AT₁

Le récepteur AT₁ est un GPCR de classe A, donc de la famille des récepteurs semblables à la rhodopsine. La majorité des effets attribués à l'AngII sur les reins et l'homéostasie cardiovasculaire est médiée par le récepteur AT₁. AT₁ est aussi une cible pharmacologique importante dans le traitement de pathologies comme l'hypertension et la prévention de dommages rénaux.

Comme les autres GPCR de sa classe, le récepteur AT₁ est constitué de 7 domaines transmembranaires (TM 1-7) hydrophobes formant des hélices α , ainsi que 3 boucles extracellulaires (ECL1-3) et 3 boucles intracellulaires (ICL1-3) reliant chaque domaine transmembranaire entre eux. Le positionnement des sept domaines transmembranaires du récepteur AT₁ forme la cavité qui accueille les ligands, la pochette de liaison, mais ils ne sont pas les seuls domaines impliqués dans cette liaison au ligand. En effet, dans le cas de l'AngII, tous les domaines extracellulaires du récepteur contribuent à la liaison du ligand au récepteur AT₁ (de Gasparo *et al.*, 2000). C'est aussi dans les domaines extracellulaires, incluant la queue N-terminale, que se trouvent les trois sites de glycosylation (Asn4, Asn176 et Asn188), ainsi que les quatre cystéines d'AT₁ (Fillion *et al.*, 2013; Shin-ichiro Miura *et al.*, 2003). Composé de 359 acides aminés, le récepteur AT₁ a une masse de 41 kDa, mais sous sa forme native ces sites sont glycosylés et sa masse passe à 61 kDa. Comme plusieurs autres GPCR, 2 cystéines (Cys¹⁰¹-Cys¹⁸⁰) forment un pont disulfure entre la première et la deuxième boucle intracellulaire du récepteur. Toutefois, les 2 cystéines supplémentaires (Cys¹⁸-Cys²⁷⁴) présentes chez AT₁ crée un second pont disulfure entre la troisième boucle intracellulaire et la queue N-terminale du récepteur. Ces ponts disulfures sont importants dans le maintien de la structure d'AT₁ et lui confèrent une sensibilité aux agents réducteurs (Fillion *et al.*, 2013; Ohyama *et al.*, 1995). Quant aux boucles intracellulaires, elles ont un rôle axé sur la signalisation. En effet, il a été démontré que certains résidus de TM3, TM5, ICL3 et hélice 8 sont d'une grande importance pour permettre au récepteur AT₁ d'activer les protéines G (de Gasparo *et al.*, 2000). En ce qui a trait de la sélectivité des voies de signalisation, ICL2 et ICL3 ont été démontrées comme étant essentielles dans l'activation de G_{q/11} par AT₁ (de Gasparo *et al.*, 2000). La portion C-terminale du récepteur, comme les boucles intracellulaires, est situé dans l'environnement intracellulaire de la cellule. Cette portion C-

terminale, aussi connue sous le nom de queue C-terminale, est impliquée dans plusieurs processus importants d'AT₁ comme la transduction de signal, la désensibilisation et l'internalisation à la suite de l'activation du récepteur (de Gasparo *et al.*, 2000; Hunyady et Catt, 2005). De plus, dans la portion située au début de la queue C-terminale, prenant une conformation d'hélice α avec une longueur d'une dizaine d'acides aminés, se trouve l'hélice 8. Cette portion de la queue C-terminale, la seule à avoir une structure secondaire, est positionnée de façon presque parallèle à la membrane plasmique. Possédant divers rôles, l'hélice 8 contribue à l'expression du récepteur, au couplage et à l'activation des protéines G, à la dimérisation du récepteur, à l'interaction protéines-lipides, ainsi qu'à l'internalisation du récepteur (Karnik *et al.*, 2015).

Lors de l'activation du récepteur AT₁, suite à la liaison de l'AngII, un réarrangement conformationnel s'opère et permet l'activation des protéines G et des voies de signalisation associées. Connu pour activer principalement G_{q/11}, AT₁ a également la capacité d'activer G_{i/o} et G_{12/13} qui vont à leurs tours activer les effecteurs étant associés. Toutefois, l'activation de protéines G n'est pas le seul mécanisme de signalisation d'AT₁ : il est aussi connu pour activer des voies de signalisation de façon indépendante des protéines G. En effet, à la suite de son activation, AT₁ est phosphorylé par les GRK permettant le recrutement des β -arrestines (β -arrestine1 et β -arrestine2) et à l'activation des voies de signalisations leurs étant associées en agissant comme intermédiaire entre le récepteur et différentes protéines signalétiques. Un autre moyen par lequel AT₁ peut induire une signalisation intracellulaire est par la transactivation du récepteur à l'EGF (EGFR). En effet, la relâche de calcium et l'activation de PKC sont deux mécanismes capables d'induire une activation d'EGFR qui mène à l'activation des MAP kinases. L'activation d'AT₁ peut aussi induire une activation de JAK et Src par PLC à la suite de sa stimulation par l'AngII (de Gasparo *et al.*, 2000; Karnik *et al.*, 2015).

1.3.2 Le récepteur AT₂

Découvert dans les années 80, le récepteur AT₂ est longtemps resté énigmatique. Toutefois, avec les efforts des dernières décennies, les percées majeures plus récentes et nos propres travaux, il est aujourd'hui possible de mieux comprendre comment fonctionne le

récepteur AT₂. Les récepteurs AT₁ et AT₂, malgré le fait qu'ils soient tous deux des récepteurs angiotensinergiques, diffèrent en plusieurs points. Ils sont différents d'un point de vue d'expression, de séquence, de structure, de signalisation et de régulation.

1.3.2.1 Expression et régulation du récepteur AT₂

AT₂ est un récepteur dont l'expression varie énormément. Au niveau fœtal, le récepteur AT₂ est fortement exprimé dans l'ensemble de l'organisme. Étant surtout présent lors du développement, il a été suggéré que le récepteur AT₂ aurait un rôle important lors du développement (Bastien *et al.*, 1996). Toutefois, les niveaux d'expression d'AT₂ diminuent dès la naissance au point de devenir indétectable, ne restant présent que dans quelques tissus spécifiques.

Le système cardiovasculaire, les glandes surrénales, les reins, la peau, le cerveau et le myomètre utérin sont des exemples de tissus où le récepteur est présent chez l'adulte. Cependant, la majorité des tissus garde la capacité de moduler l'expression du récepteur AT₂ en réponse à l'environnement. En effet, il est connu qu'il peut y avoir une augmentation de l'expression d'AT₂ lors de certaines conditions pathologiques. En effet, lorsqu'il y a présence d'une lésion de la peau, d'un infarctus du myocarde, de diabète, d'une néphropathie ou de fibrose pulmonaire, il est possible d'observer une augmentation de l'expression d'AT₂ (Booz et Baker, 1996; Lemarié *et al.*, 2010). De plus, au niveau du cerveau, AT₂ pourrait être impliqué dans la régulation du RAS pour le contrôle de l'osmolarité, ainsi qu'être impliqué dans la modulation de certaines fonctions cognitives et comportementales (Karnik *et al.*, 2015). Il a donc été suggéré qu'AT₂ pourrait avoir un rôle important à jouer dans des processus de régénération et de protection du tissu neuronal (Steckelings *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Structure du récepteur AT₂

Le récepteur AT₂ est un GCPR de classe A, similaire à la rhodopsine, et est d'une longueur de 363 acides aminés codé par un seul exon présent sur le chromosome X. Malgré la faible homologie de séquence entre AT₁ et AT₂ (34%), les résidus identifiés comme étant importants dans la liaison de l'AngII à AT₁ sont conservés chez AT₂. Par exemple, les

résidus Lys¹⁰², Arg¹⁶⁷ et Lys¹⁹⁹ du récepteur AT₁ sont présent dans le récepteur AT₂ sous la forme des résidus Lys¹¹⁸, Arg¹⁸³ et Lys²¹⁶. En revanche, la séquence de l'ICL3 et la queue C-terminale divergent fortement entre AT₁ et AT₂. Il a été suggéré dans la littérature que ce soit l'une des raisons pour lesquelles AT₂ ne semble pas ou peu capable de s'associer aux protéines G (de Gasparo *et al.*, 2000). Cela pourrait aussi expliquer le l'absence de phosphorylation par les GRK et l'absence de recrutement de β -arrestines à la suite de son exposition à l'AngII (de Gasparo *et al.*, 2000; Karnik *et al.*, 2015).

Cependant, de précieuses connaissances ont été acquises à la suite de la première publication de la structure cristalline du récepteur AT₂ en 2017 (H. Zhang *et al.*, 2017). Résolue par *serial femtosecond crystallography* et en utilisant une densité élevée de microcristaux en phase lipidique cubique (figure 3a), la structure cristalline d'AT₂ a permis de confirmer la présence de plusieurs similitudes avec le récepteur AT₁. La conformation de « *β -hairpin* » de l'ECL2 en est un exemple. De plus, deux ponts disulfures sont présents du côté extracellulaire d'AT₂ : Cys35^{N-term}-Cys290^{ECL3} relie la queue N-terminal à l'ICL3 et Cys117^{3.25}-Cys195^{ECL2} relie l'extrémité du TM3 à l'ECL2 (H. Zhang *et al.*, 2017).

En revanche, une comparaison plus approfondie de la structure d'AT₂ révèle plusieurs différences importantes avec AT₁, ainsi qu'avec les autres GPCR de classe A. Comme nous l'avons vu à la section 1.1.2 traitant de l'activation des GPCR, l'activation d'un GPCR de classe A est un processus qui induit des changements bien identifiés au niveau des domaines transmembranaires qui regroupent entre-autre les motifs DRY, NPxxY et PIF (Figure 3). Toutefois, la structure d'AT₂ obtenue en 2017 montre des caractéristiques qui sont habituellement uniquement présents dans les récepteurs actifs : l'extrémité intracellulaire du TM6 est déplacée vers l'extérieur du récepteur puisque l'Arg142^(3.50) du motif DRY est tourné de 90° comparativement à AT₁, empêchant la formation de l'« *ionic lock* »; du côté extracellulaire, le TM5 est déplacé vers l'intérieur du récepteur, permettant une réorganisation du motif PIF vers un arrangement typiquement actif; au niveau du motif NPxxY, la Tyr318^(7.53) d'AT₂ est déplacé vers l'intérieur du récepteur et tournée de 45° comparativement à AT₁, TM7 est donc délocalisé vers l'intérieur du récepteur. Par conséquent, l'ensemble de ces caractéristiques conformationnelles indiquent, lorsqu'on les

compare aux structures cristallines de d'autres GPCR de classe A actifs, qu'AT₂ adopte une conformation de type active. Cette organisation particulière du récepteur AT₂ pourrait expliquer sa forte activité constitutive (H. Zhang *et al.*, 2017). Ce sujet sera abordé dans la section suivante.

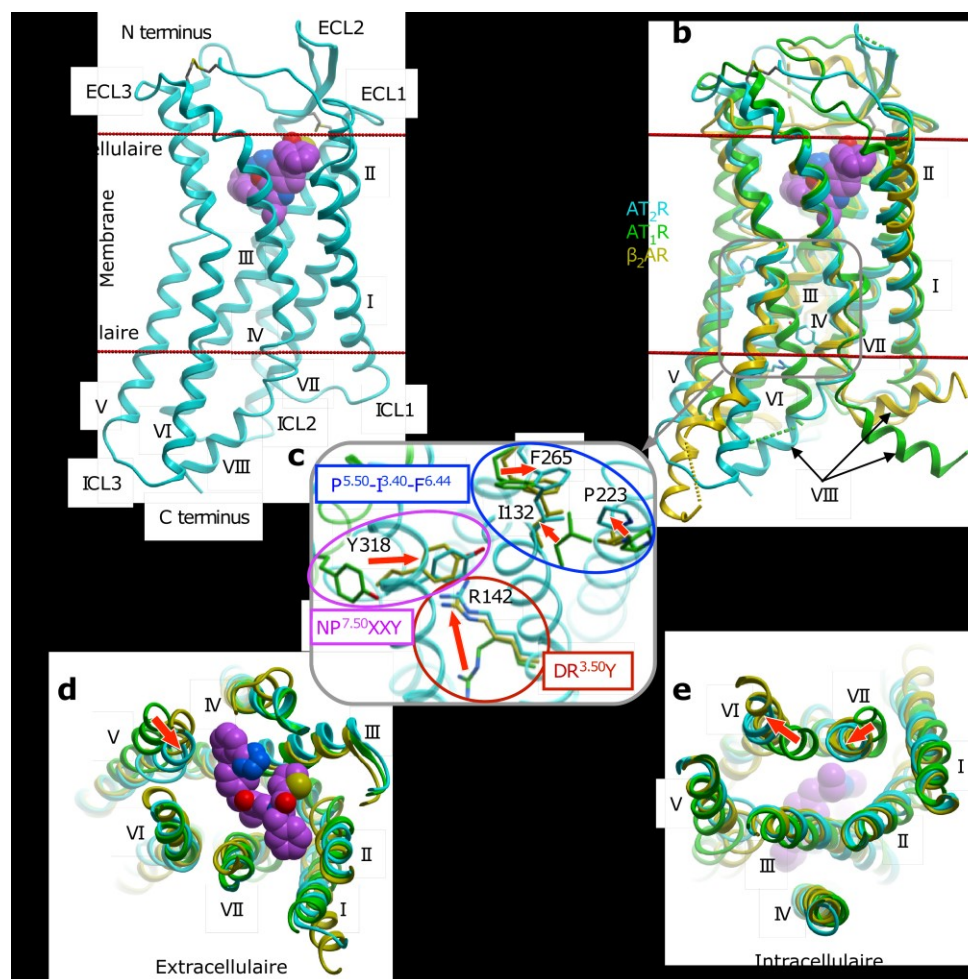


Figure 3. Conformation active d'AT₂.

a, L'architecture globale du récepteur. Les limites des membranes sont indiquées par des lignes rouges. b–e, Comparaison d'AT₂ de type actif (cyan) avec l'AT₁ inactif (vert) et le récepteur β₂AR liée à la protéine G active (jaune) (b), le côté extracellulaire (d) et le côté intracellulaire sans l'hélice 8 (e). La région agrandie en c montre les détails des motifs conservés. AT₂ est représenté par un dessin en cyan, et la position inactive distincte de l'hélice AT₁ VII est indiquée en vert. Les flèches rouges indiquent les changements de conformation associés à l'activation du récepteur. Figure de (H. Zhang *et al.*, 2017)

Une deuxième différence importante fut décelée lors de la première publication de la structure d'AT₂ par le groupe de Vadim Cherezov en 2017 (H. Zhang *et al.*, 2017). Habituellement, comme chez AT₁, l'hélice 8 est pointée vers l'extérieur du récepteur de sorte à être parallèle à la membrane plasmique de la cellule et ce positionnement est généralement indépendant de l'activation, ou non, du récepteur. Toutefois, chez AT₂, l'hélice 8 est positionnée vers l'intérieur du récepteur (Figure 3b). Venant remplir la pochette de liaison intracellulaire, ce positionnement atypique de l'hélice 8 est stabilisée par plusieurs interactions avec les extrémités intracellulaires des TM 3, 5 et 7: les résidus Phe325^(8.50), Leu329^(8.54), Val332^(8.57) et Phe333^{8.58} participent à des interactions hydrophobes; et les résidus Arg324^(8.49), Gln326^(8.51) et Lys328^(8.53) participent à des interactions polaires. Ce positionnement atypique de l'hélice 8 a donc pour conséquences non seulement de stabiliser le récepteur AT₂ dans une conformation active, mais aussi d'induire un encombrement stérique bloquant le recrutement de protéines G et de β -arrestines (H. Zhang *et al.*, 2017). Ces conséquences s'avèrent d'autant plus révélatrices lorsqu'on tient compte de la signalisation atypique du récepteur AT₂.

1.3.2.3 Signalisation du récepteur AT₂

Les mécanismes de transduction par lesquelles le récepteur AT₂ exerce ses effets physiologiques sont considérés comme étant atypiques. En ce sens, contrairement à AT₁, AT₂ ne semble pas être en mesure de signaler de façon canonique via les protéines G. D'un côté, une étude a observé qu'AT₂ semble être capable de coupler G α_{i2} et G α_{i3} dans des cellules fœtales de rat (J. Zhang et Pratt, 1996), mais à ce jour, il n'a jamais été démontré qu'AT₂ était capable d'activer directement les voies canoniques associées aux GPCR par un essai fonctionnel. De plus, il n'a pas encore été possible de démontrer qu'AT₂, à la suite de son exposition à des agonistes comme l'AngII, soit désensibilisé ou internaliser comme les autres GPCR de classe A le sont. Toutefois, malgré l'incertitude persistante en ce qui concerne les mécanismes initiaux de transduction de signal au niveau du récepteur, l'étude de la signalisation d'AT₂ a beaucoup progressé et plusieurs voies de signalisation, ainsi que leurs effets cellulaires et physiologiques, sont maintenant connues (Figure 4) (Karnik *et al.*, 2015).

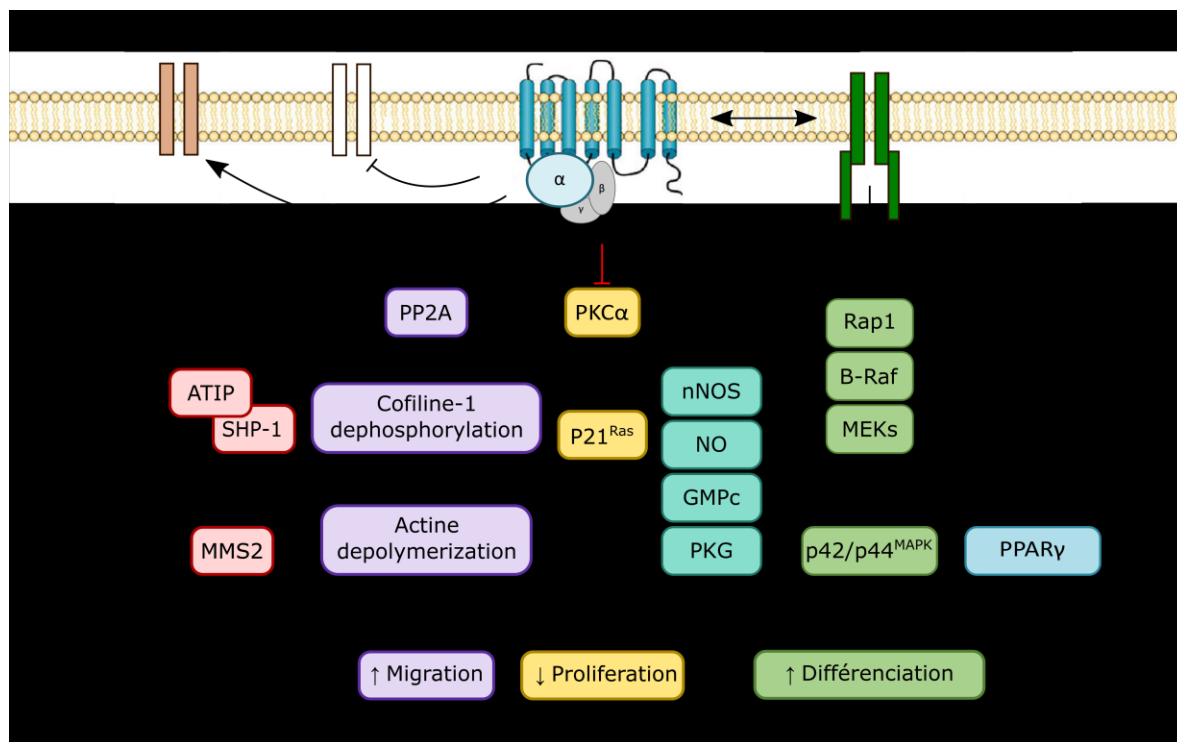


Figure 4. Un aperçu de la signalisation d'AT₂.

Représentation de différentes voies de signalisation d'AT₂ résultant de son activation par l'AngII.

Dans un premier temps, le récepteur AT₂ a été démontré comme étant capable de moduler l'activité neuronale par l'entremise de certains canaux ioniques : dans les cellules NG108-15, AT₂ induit une inhibition des canaux calciques de type T; et dans des cultures cellulaires neuronales de jeunes rats, AT₂ induit une activation des canaux potassiques (Karnik *et al.*, 2015; Nouet et Nahmias, 2000). L'activation des canaux potassiques par AT₂ est médiée par la phospholipase A₂ (PLA₂), qui à son tour, va activer la phosphatase PP2A (Karnik *et al.*, 2015; Nouet et Nahmias, 2000; Zhu *et al.*, 1998). AT₂ active aussi les phosphatases MKP-1 et SHP-1 (de Gasparo *et al.*, 2000; Guimond et Gallo-Payet, 2012; Karnik *et al.*, 2015). Ces 3 phosphatases (PP2A, MKP-1 et SHP-1) ont toutes été démontrées comme étant capables d'inhiber la voie des MAPK, impliquée dans la prolifération cellulaire. Il est aussi important de mentionner qu'AT₂ est capable d'inhiber la prolifération cellulaire par l'inhibition de PKCα et de p21^{ras} (Gendron *et al.*, 1999). Cependant, bien que l'activation de ces phosphatases puisse induire une inhibition des MAPK dans certains tissus, la

stimulation du récepteur AT₂ présent sur les cellules NG108-15 induit une élongation des neurites par une stimulation soutenue des MAPK (Plouffe *et al.*, 2006). Toujours dans les cellules NG108-15, le récepteur AT₂ a aussi été démontré comme étant capable d'activer les MAPK par la transactivation du récepteur TrkA (Bedecs *et al.*, 1997). Ramenant notre attention sur SHP-1, son activation par AT₂ est aussi impliquée dans une deuxième voie de signalisation. À la suite de son activation par AT₂, SHP-1 forme un complexe avec la protéine d'interaction d'AT₂ (ATIP) et SHP-1-ATIP transloque ensuite au noyau où elles induiront une augmentation de l'expression de MMS2 (Li *et al.*, 2007). MMS2 est connu comme étant impliqué dans la réparation de l'ADN, dans le système ubiquitine-protéasome, ainsi que dans la différenciation neuronale (Li *et al.*, 2007). Une autre voie de signalisation associée au récepteur AT₂, par laquelle il peut induire une différenciation cellulaire, est l'augmentation de l'expression et de l'activation de PPAR γ (de Gasparo *et al.*, 2000; Karnik *et al.*, 2015). Considéré comme étant un « maître régulateur » pour la différenciation des adipocytes, PPAR γ a aussi des effets physiologiques bénéfiques dans des pathologies comme le diabète et potentiellement le syndrome des ovaires polykystiques (Gallo-Payet *et al.*, 2012). En ce sens, il a été rapporté qu'un traitement avec le C21 (agoniste sélectif non peptidique de AT₂) chez un modèle de rat obèse du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) a normalisé bon nombre des phénotypes délétères associés à cette maladie (Leblanc *et al.*, 2014). De plus, la stimulation du récepteur AT₂ induit une production de NO et de GMPc, tous deux étant impliqués dans l'élongation des neurites dans les cellules NG108-15 (Côté *et al.*, 1998; Gendron *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2004). La production de NO, induisant une vasodilatation au niveau du système vasculaire, est un autre effet physiologique étant associé au récepteur AT₂ (Verdonk *et al.*, 2012).

La forte activité constitutive d'AT₂ constitue une caractéristique intéressante de ce récepteur, grâce à laquelle la régulation de l'activation des voies de signalisation d'AT₂ pourrait être médiée par la simple régulation de son expression au niveau des tissus. Toutefois, une connaissance plus approfondie de la relation entre la structure du récepteur AT₂ et de ses mécanismes de transduction de signal est nécessaire pour tenter de répondre à ce type de question et éventuellement permettre de trouver de nouvelles façons d'exploiter ce récepteur en tant que cible thérapeutique (Karnik *et al.*, 2015; H. Zhang *et al.*, 2017).

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

Avec la publication de la structure du récepteur AT₂, il a été possible de constater que ce dernier présentait diverses caractéristiques atypiques comparativement à d'autres GPCR de classe A. Nous postulons comme hypothèse que le positionnement atypique de l'hélice 8 présent dans la structure du récepteur AT₂ serait causé par l'importante polarité des résidus contenus dans la première boucle intracellulaire (ICL1).

Objectif 1 : Établir le profil de signalisation dépendant des protéines G du récepteur AT₂.

N'ayant jamais été publié, nous voulions établir le profil de signalisation dépendant des protéine G du récepteur AT₂ par l'utilisation d'essais fonctionnels BRET. Nous voulions aussi déterminer quelles sont les premières étapes de transduction de signal du récepteur AT₂. Ceci était non seulement essentiel en soit, mais servirait aussi de point de référence lors de l'analyse des résultats issus de l'objectif 2.

Objectif 2 : Caractériser le rôle de la première boucle intracellulaire et de l'hélice 8, ainsi que leurs influences sur la signalisation du récepteur AT₂.

Dans le but d'identifier l'implication de la première boucle intracellulaire et de l'hélice 8 sur la signalisation de récepteur AT₂, nous avons conçu une série de chimères des récepteurs AT₁ et AT₂ en substituant l'hélice 8 ou l'ICL1 dans chacun des récepteurs afin d'explorer leurs rôles dans la signalisation du récepteur AT₂.

Objectif 3 : Caractériser les événements de phosphorylation induits par l'activation du récepteur AT₂.

Dans le but d'obtenir une compréhension plus large des mécanismes de signalisation d'AT₂ et des voies de signalisation lui étant associées, nous avons analysé les modifications du phosphoprotéome par spectrométrie de masse à la suite d'une stimulation du récepteur AT₂.

ARTICLE

Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation

Auteurs de l'article: Alexandre Connolly, Brian Holleran, Élie Simard, Jean-Patrice Baillargeon, Pierre Lavigne, Richard Leduc

Statut de l'article: accepté à *Biochem. Pharmacol.* le 19 juillet 2019

Avant-propos: J'ai une participation majeure concernant la rédaction du manuscrit. J'ai réalisé pratiquement toute la partie expérimentale de ce manuscrit et j'ai une contribution importante au montage des figures.

Résumé : Les mécanismes de signalisation du récepteur de type 2 de l'angiotensine II (AT₂R), un récepteur à sept domaines transmembranaires, n'ont pas encore été clairement et complètement définis. Dans la présente contribution, nous avons cherché à identifier les déterminants moléculaires impliqués dans l'activation de l'AT₂R. Bien qu'il n'ait pas été démontré que AT₂R engage les voies G_{q/11}, G₁₂, G_{i2} et β -arrestine (β arr) comme le récepteur AT₁R suite à la stimulation par l'angiotensine II (AngII), le positionnement atypique de l'hélice 8 dans la structure AT₂R récemment publiée peut jouer un rôle dans la capacité du récepteur à se coupler aux effecteurs en aval. Dans la structure d'AT₂R, l'hélice 8 pointe vers l'intérieur et vers la boucle intracellulaire 3 (ICL3) pour former des interactions tertiaires avec le domaine transmembranaire 6 (TM6), empêchant éventuellement l'accès aux effecteurs de signalisation. Par ailleurs, dans la plupart des GPCR de classe A, il s'avère que l'hélice 8 est engagée dans des interactions tertiaires avec ICL1 et à distance du site de liaison de l'effecteur. Après un examen plus approfondi de la structure d'AT₂R, nous avons constaté que les résidus contenus dans la boucle intracellulaire 1 (ICL1) pouvaient être impliqués dans la formation de cette conformation inhabituelle de l'hélice 8. Pour explorer cette hypothèse, nous avons conçu une série de chimères des récepteurs AT₁R / AT₂R afin de valider les rôles de ICL1 et de l'hélice 8 dans la signalisation d'AT₂R. La substitution de l'ICL1 d'AT₁R à AT₂R a conduit à un récepteur mutant couplé à G_{i2}. La substitution des domaines hélicoïde 8 et C-terminal de AT₂R dans le squelette AT₁R a conduit à un récepteur mutant qui conservait les propriétés de signalisation de type AT₁R. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale d'AT₂R est compatible avec la signalisation canonique des GPCR et que ICL1 d'AT₂R est impliqué dans le repositionnement de l'hélice 8, ce qui entrave l'engagement des effecteurs classiques des GPCR tels que les protéines G ou les arrestines.

Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation.

Alexandre Connolly^{1,2}, Brian Holleran^{1,2}, Élie Simard^{1,2}, Jean-Patrice Baillargeon⁴, Pierre Lavigne^{2,3}, Richard Leduc^{#1,2*}

¹ Department of Pharmacology-Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

² Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

³ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

⁴ Division of Endocrinology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, J1H 5N4, Québec, Canada.

Running title: Role of ICL1 and helix VIII in AT₂R activation

[#]Corresponding author

Richard Leduc, Ph.D.
 Department of Pharmacology
 Faculty of Medicine and Health Sciences
 Université de Sherbrooke
 Sherbrooke, Quebec
 Canada, J1H 5N4
 Tel.: (819) 564-5413
 Fax: (819) 564-5400
 E-mail: Richard.Leduc@USherbrooke.ca

Abstract

The signaling mechanisms of the angiotensin II type 2 receptor (AT₂R), a heptahelical receptor, have not yet been clearly and completely defined. In the present contribution, we set out to identify the molecular determinants involved in AT₂R activation. Although AT₂R has not been shown to engage G_{q/11}, G₁₂, G_{i2}, and β -arrestin (β arr) pathways as does the AT₁R upon angiotensin II (AngII) stimulation, the atypical positioning of helix VIII in the recently published AT₂R structure may play a role in the receptor's capacity to couple to downstream effectors. In the AT₂R structure, helix VIII points inwards and towards intracellular loop 3 (ICL3) to form tertiary interactions with transmembrane domain 6 (TM6), possibly impeding access to signaling effectors. On the other hand, in most class A GPCRs, helix VIII is found to be engaged in tertiary interactions with ICL1 and away from the effector binding site. Upon closer examination of the AT₂R structure, we found that the residues contained within intracellular loop 1 (ICL1) may be involved in driving this unusual conformation of helix VIII. To explore this hypothesis, we designed a series of AT₁R/AT₂R receptor chimeras to validate the roles of ICL1 and helix VIII in AT₂R signaling. Substituting the AT₁R ICL1 into AT₂R led to a mutant receptor that coupled to G_{i2}. The substitution of the helix VIII and C-terminal domains of AT₂R into the AT₁R backbone led to a mutant receptor that retained AT₁R-like signaling properties. These results suggest that the C-terminal portion of AT₂R is compatible with canonical GPCR signaling and that ICL1 of AT₂R is involved in repositioning helix VIII, which impedes engagement of classical GPCR effectors such as G proteins or β -arrestins.

Keywords: Angiotensin II, Angiotensin II Receptor, GPCR, chimeric receptors, signaling.

1. INTRODUCTION

The octapeptide hormone angiotensin II (AngII) is the main effector of the renin-angiotensin system, which is involved in several physiological functions that control vasoconstriction, cardiac output, fluid volume, cellular growth and hydromineral balance. AngII binds to and activates the angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) and the type 2 receptor (AT₂R), both members of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily, but most of AngII's effects are mediated through AT₁R [1–3].

Although the signaling signature of activated AT₁R is complex, a plethora of studies have revealed that it couples to G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} and G α_i [4–6]. AT₁R activation also leads to recruitment of β -arrestins (β arrs), involved in desensitization of the receptor and in acting as scaffolding proteins that mediate other signaling pathways [7,8]. Activation of AT₁R's G protein-dependent and independent pathways regulate various downstream effectors such as the activation of phospholipase C, protein kinase C, MAPK [4,9] and many other effectors [6].

Reports show that AT₂R counteracts AT₁R-mediated physiological responses [1], exhibits cardioprotective effects and induces vasodilatation as well as inhibits cell proliferation [10–12]. Expression of AT₂R is increased in various pathological conditions associated with inflammation and tissue remodeling, including in hypertensive type 2 diabetic patients treated with the AT₁R antagonist valsartan [1,13,14]. In type 2 diabetes, AT₂R counteracts the deleterious effects of AT₁R on insulin receptor signaling [15,16]. Treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) model rats with C21 (a non-peptidic AT₂R selective agonist) normalized many of the deleterious phenotypes associated with this disease [16]. Furthermore, C21 was recently granted orphan drug status for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [17]. Although AT₂R is potentially an important drug target, the signaling mechanisms associated with AT₂R remain elusive and controversial. Having the typical seven transmembrane domain topology, it would be expected that upon activation conformational changes of AT₂R would enable its interaction with G proteins, however such a mechanism has not yet been clearly demonstrated. While it has been reported that AT₂R activation does not lead to second messenger production [18,19], the finding that AngII-activated AT₂R immunoprecipitates with G α_{i2} and G α_{i3} in rat fetal membranes [20] coupled with the demonstration that pertussis toxin (PTX), a non-selective G α_i inhibitor, prevents

AT₂R signaling, suggest a G α_i -dependent mechanism. Indeed, inhibition of AT₂R-dependent activation of the NO/cGMP pathway with PTX, impedes neuronal differentiation of NG108-15 cells [21]. Reports have also shown that AT₂R activates downstream tyrosine and serine/threonine phosphatases such as SHP-1, MKP-1 and PP2A [22–24]. Additional studies have shown that AT₂R activation inhibits or activates the ERK pathway depending on the cellular model studied, further contributing to the ambiguous nature of AT₂R signaling [25]. On the other hand, it has previously been shown that upon activation although the AT₂R undergoes PKC-dependent phosphorylation [26] it is unable to interact with β -arrestin2 and is not internalized [27].

We hypothesize that AT₂R may be unable to efficiently recruit and activate G proteins because of an atypical conformation. Therefore, we first evaluated the capacity of AngII to activate the G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} and G α_i and β -arrestin signaling pathways via AT₂R. To better understand the molecular mechanisms involved in AT₂R activation and evaluate the roles of helix VIII and ICL1 in this process, we constructed a series of AT₁R/AT₂R receptor chimeras, based on the above-mentioned observations of the AT₁R and AT₂R structures. We then tested the capacity of AngII to activate the G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} , G α_i , and β -arrestin signaling pathways on these constructs. Our findings lead us to suggest an interplay between ICL1 and helix VIII of AT₂R that would impede interactions with G proteins and β -arrestins.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Culture media, FBS, penicillin, streptomycin, and trypsin were acquired from Wisent (St-Bruno, Qc). Polyethylenimine (PEI) was acquired from Polyscience (Warrington, PA). ^{125}I -AngII (specific radioactivity ~ 1000 Ci/mmol) was prepared with Iodo-GEN® (Perbio Science, Erembodegem, Belgium) as reported previously [28].

2.2 Plasmids and constructs

The cDNA for the human AT₁R was kindly provided by Dr. Sylvain Meloche (Université de Montréal). SP_Flag_hAT₂R receptor was constructed by using QuikChange XL with a primer containing the SP (signal peptide) (AAGACGATCATCGCCCTGAGCTACATCTTCTGCCTGGTGTTCGCC) sequence that is inserted N-terminal to the Flag epitope. The chimeras SP-Flag-hAT₁R(1-307)-hAT₂R(324-363) and SP-Flag-hAT₂R(1-323)-hAT₁R(308-359), renamed AT₁(AT₂-CT) and AT₂(AT₁-CT) respectively, were constructed by gBlocks from Integrated DNA Technologies. Chimeras SP-Flag-hAT₁R(1-52)-hAT₂R(69-80)-hAT₁R(65-359) and SP-Flag-hAT₂R(1-68)-hAT₁R(53-64)-hAT₂R(81-363), named AT₁(AT₂-ICL1) and AT₂(AT₁-ICL1) respectively, were constructed with the Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit using the SP-Flag-AT₁R and SP-Flag-AT₂R constructs as templates. All chimeras were cloned in pcDNA 3.1 neo (+) vector and were confirmed by automated DNA sequencing.

2.3 Cell culture and transfections

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL. Atmosphere was humidified, set at 37°C and 5% CO₂. Transient expression of recombinant proteins was achieved by transfecting cell with PEI at a 3:1 ratio (w/w) with plasmid DNA.

2.4 Binding experiments

HEK293 cells transiently expressing each receptor were washed once with PBS and submitted to one freeze-thaw cycle and gently scraped into washing buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Cells were then centrifuged for 15 min 2500 x g at 4°C and resuspended in binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% bovine serum albumin, 0.01% bacitracin). Saturation experiments were performed by incubating 120 µL of prepared cell suspension for 1h at room temperature with

40 μ L of increasing concentration of radiolabeled AngII and 40 μ L of binding buffer (for total binding) or with 40 μ L of increasing concentrations of radiolabeled AngII and 100 μ L for a high concentration (5 μ M) of non-radiolabeled AngII (non-specific binding). After the 1h incubation period, the bound radioactivity was separated from free ligand by filtration. Receptor-bound radioactivity was evaluated by γ counting.

2.5 BRET² assays

Biosensors for $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{12}$ were kindly provided by Michel Bouvier (University of Montréal). For BRET² assays, HEK293 cells were transfected with 250 ng of receptor, 40 ng of $G\alpha$ subunit, 250 ng of $G\beta_1$ subunit and 250 ng of $G\gamma_1$ subunit per 1 μ g of total transfected DNA. The $G\gamma_2$ subunit was used with $G\alpha_{i2}$. Salmon sperm DNA (SSD) was used to bring total transfected DNA to 1 μ g per 1 mL of cell (350,000 cells/mL). Cells were plated at 35,000 cells per well in 96-well, flat bottom, white opaque tissue culture plates. 48 hours after seeding, cells were gently washed with PBS and 80 μ L of BRET buffer (10 mM HEPES, 1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl_2$, 4.2 mM KCl, 146 mM NaCl and 5.5 mM glucose) is added to each well. Cells were then protected from light and left 1 hour at room temperature. 10 μ L of 50 μ M coelenterazine 400a is added per well and incubated at room temperature for 10 min. The cells were then treated with 10 μ L of increasing concentrations of AngII. The BRET² signal is then acquired using a BERTHOLD TriStar² LB 942 Multimode Reader. The BRET ratio is then calculated by dividing the acceptor's luminescence reading by the donor's fluorescence.

2.6 IP-One assay

The IP-One assay was performed according to the manufacturer's provided protocol. Briefly, 15,000 HEK293 cells transiently expressing receptors were seeded in 384-well shallow well plates and treated with increasing concentrations of AngII for 30 min. IP1-d2 and anti-IP1-Cryptate were then added and the plate was incubated for 3 hours at room temperature with agitation. FRET signal was measured with a TECAN M1000 fluorescence plate reader (320 nm excitation and 620 and 665 nm emission).

2.7 Data analysis

The efficacy and EC_{50} values of BRET², IP-One and Lance Ultra cAMP were calculated with the dose response-stimulation three parameter nonlinear regression in GraphPad Prism 8 (San Diego CA). K_d was calculated using the one site-total and

nonspecific binding nonlinear regression. All experiments were done a minimum of 3 times independently and errors are expressed as \pm S.E.M.

2.8 Molecular Modelling

Primary structure alignment using BlastP (Altschul *et al.*, 1997) reveals that there is only one gap of a single residue between the primary structures of the AT₁R (Uniprot entry P30556) and AT₂R (Uniprot entry P50052). This gap is located within the ICL2 of the AT₂R. Hence all TMs and loops have the same length. In this context, all the different models of the chimeras and states have been generated using Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) by manually replacing the corresponding residues onto the structures of either the AT₁R (PDB entry 4YAY) or AT₂R coordinates. When residues were different, a rotameric state with no clashes was selected for the replacement residue.

3. RESULTS

3.1 Construction of *AT₁R-AT₂R* chimeras.

Recently, the elucidation of the crystal structure of AT₂R revealed many atypical features when compared to the structure of AT₁R or other GPCR structures [30]. One such feature is the peculiar position of AT₂R's helix VIII that orients itself towards the intracellular loops (ICLs) whereas AT₁R's helix VIII is found parallel to membranes leaving ICLs open to interaction with cytoplasmic effectors. This positioning of AT₂R's helix VIII could potentially block G protein and β -arrestin binding thereby hindering AT₂R signaling. Conversely, in most Class A GPCR structures, helix VIII rather forms favorable hydrophobic tertiary interactions with ICL1, such as was found for the AT₁R crystal structure (Figure 1C). Upon close inspection of the residues that compose AT₂R's ICL1, we noted the presence of polar residue Gln72 and charged residue Lys73 that may contribute to destabilizing the interaction between helix VIII and ILC1 and which could potentially lead to the atypical conformation of the AT₂R helix VIII domain (Fig. 1D). To better understand how AT₂R's structure can control its activation we constructed chimeric mutants and determined their pharmacological and signaling properties. The first construct was AT₁(AT₂-ICL1) where the ICL1 of AT₂R (residues 69-80) is swapped into AT₁R (Fig. 1E) and the second was AT₂(AT₁-ICL1), where the ICL1 of AT₁R (residues 53-64) is swapped into AT₂R (Fig. 1F). Note that both ICL1s have the same number of residues and are positioned identically compared to all conserved motifs and residues. The other constructs were AT₁(AT₂-CT), where helix VIII and the C-tail of AT₂R is swapped into AT₁R and AT₂(AT₁-CT), where helix VIII and the C-tail of AT₁R is swapped into AT₂R.

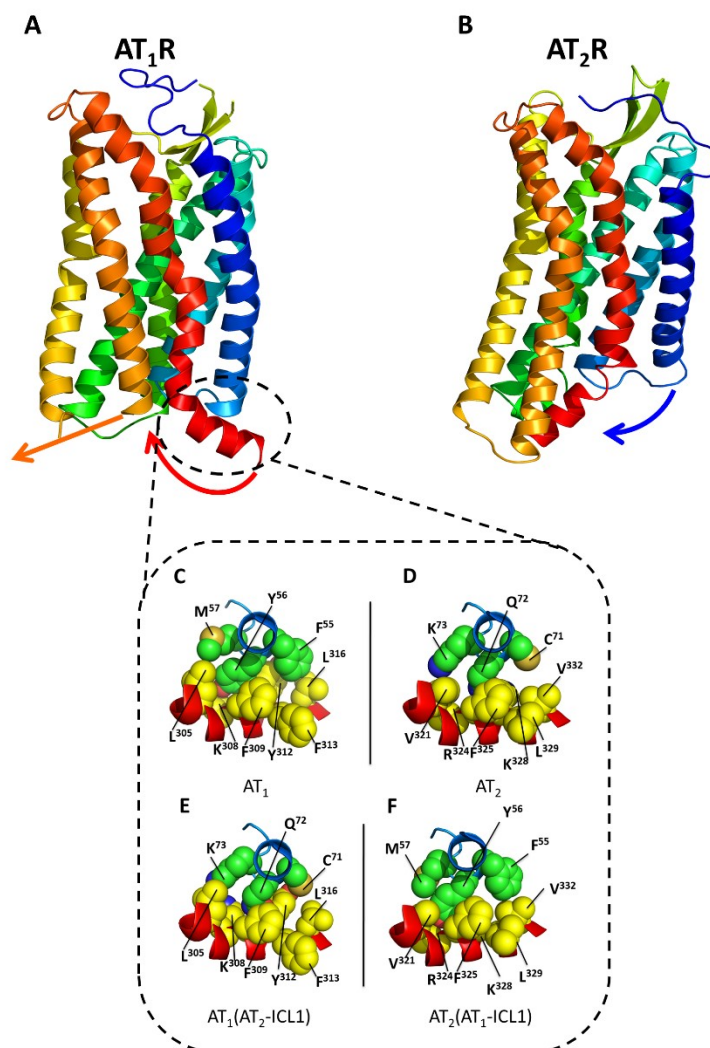


Fig. 1. Tri-dimensional structures of the resting state of AT₁R and AT₂R. We propose that there exists a conformational equilibrium involving Helix VIII exchanging between two states characterized by tertiary interactions with ICL1 (AT₁R-like conformation) (A) or TM6 (AT₂R-like conformation) (B). Rainbow colored backbone (blue to red; N- to C-terminal) of the structure of AT₁R (4YAY) on the top left, or the structure of AT₂R (5UNG) on the top right. C. Wild type tertiary interactions between helix VIII and ICL1 in the AT₁R (4YAY). Note the complementary packing of interfacial hydrophobic side-chains. D. Modeling of the AT₂R helix VIII/ICL1 interaction in the AT₁R-like conformation. Note that these hydrophobic interactions are disrupted by ICL1 (K⁷³ vs. M⁵⁷; Q⁷² vs. Y⁵⁶ and C⁷¹ vs. F⁵⁵) despite the conservation of the hydrophobic surface of helix VIII of the AT₂R. E. Modeling of the AT₁R helix VIII/ AT₂R ICL1 interaction in the AT₁(AT₂-ICL1) chimera. Similarly, unfavorable interactions are expected. F. Modeling of the AT₂R helix VIII/ AT₁R ICL1 interaction in the AT₂(AT₁-ICL1) chimera. Based on the conservation of the hydrophobic character of the helix VIII interacting surface, interactions between the helix VIII of the AT₂R and the AT₁R ICL1 domain are expected to be tolerated and feasible.

3.2 Binding properties of AngII towards AT₁R, AT₂R and chimeras

We assessed the binding properties of AngII for AT₁R, AT₂R and the receptor chimeras that were transiently expressed in HEK293 cells. For the wild type receptors, AngII showed a binding affinity in the low nanomolar for both AT₁R ($K_d = 1.6$ nM) and AT₂R ($K_d = 4.7$ nM). As for the chimeras, none of the receptor alterations significantly altered the affinity of AngII towards these receptors with dissociation constants in the low nanomolar range for the following chimeras: AT₁(AT₂-ICL1), $K_d = 2.6$ nM and AT₂(AT₁-ICL1), $K_d = 3.9$ nM, AT₁(AT₂-CT), $K_d = 2.1$ nM and AT₂(AT₁-CT), $K_d = 4.4$ nM. All receptors were well expressed with Bmax values ranging from 1.7 pmol/mg to 14.1 pmol/mg (Table 1). We have also confirmed the presence of all receptors using the C-terminal FLAG epitope (data not shown).

Table 1
Binding properties of AT₁R, AT₂R and chimeric receptors

	K_d (nM)	Bmax (pmol / mg)	n
AT ₁	1.6 ± 0.5	2.5 ± 0.1	3
AT ₂	4.7 ± 1.0	14.1 ± 1.5	3
AT ₁ (AT ₂ -ICL1)	2.6 ± 0.7	1.7 ± 0.3	3
AT ₂ (AT ₁ -ICL1)	3.9 ± 1.2	4.8 ± 0.9	3
AT ₁ (AT ₂ -CT)	2.1 ± 0.6	5.4 ± 0.4	3
AT ₂ (AT ₁ -CT)	4.4 ± 1.7	5.1 ± 1.2	3

Table 1. HEK293 cells stably expressing the indicated receptors were assayed as described in the methods. Binding affinities (K_d) are expressed as the means \pm SD of values obtained in n independent experiments performed in duplicate.

3.3 Functional properties of AT₁R and AT₂R receptors

We first characterized the ability of the wild-type receptors to couple and activate various G protein and β arr signaling pathways associated with the wild type AT₁R and AT₂R in HEK 293 cells using established BRET based biosensor assays. Although AT₁R signaling has been extensively characterized [6,31,32], the signaling properties of the AT₂R have not yet been clearly defined. In the wild-type and chimeric constructs, the activation of a given

G protein pathway was ascertained when the BRET² ratio diminished following dissociation of the G α -RlucII and G γ -GFP subunits. We first assessed the activation of the G_q pathway in a dose-response manner by submitting either AT₁R or AT₂R to increasing doses of AngII. On the AT₁R, AngII showed a potency (EC₅₀) of 4.9 nM and its efficacy (E_{max}) was normalised to 100% (Fig. 2A). However, AngII was unable to activate the G_q pathway via AT₂R. We next measured the G_{i2} (Fig. 2B) and G₁₂ (Fig. 2C) pathways, where AngII exhibited a potency of 2.6 nM and 6.7 nM respectively towards AT₁R, which were both again normalized to 100% efficacy. Conversely, engagement of either G_{i2} (Fig. 2B) or G₁₂ (Fig. 2C) to AT₂R following AngII stimulation did not lead to a measurable shift in BRET signals. We then assessed the capacity of AT₁R and AT₂R to recruit β -arrestins upon AngII activation. Unlike the biosensors used for G protein dependent pathways, β -arrestin recruitment following AngII stimulation leads to an increase in BRET² signal. AngII stimulation of the AT₁R enabled recruitment of β arr-1 (Fig. 2D) and β arr-2 (Fig. 2E) with a potency of 16.6 and 2.2 nM respectively; efficacy was normalized to 100%. However, for AT₂R, no BRET signal was detected upon AngII stimulation. The parameters describing the activation of AT₁R with AngII in a dose response manner were used as a reference for the activation of the subsequent chimeric receptor mutants.

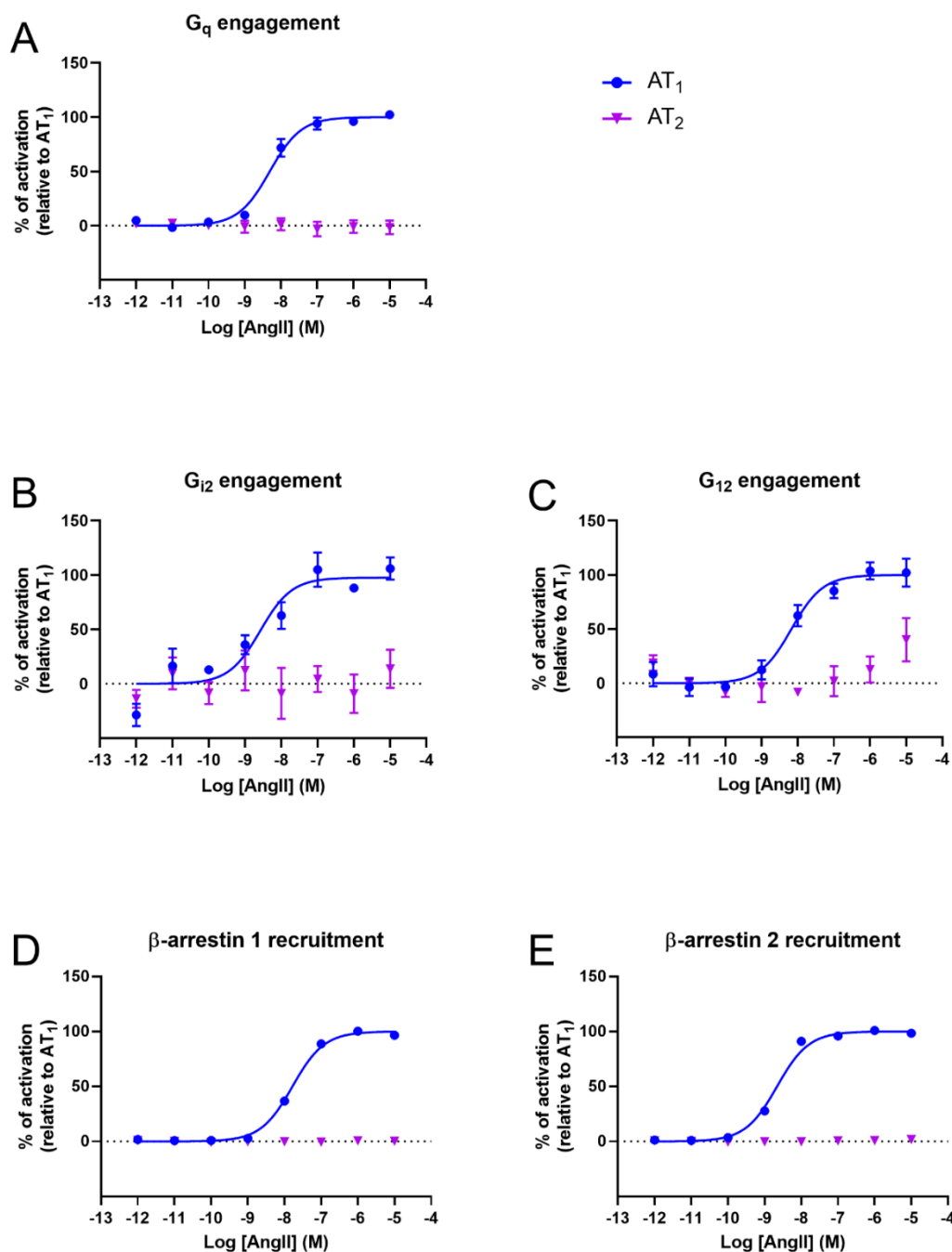


Fig. 2. Activation of G protein and β -arrestin signalling pathways with increasing concentration of AngII for wild type receptors. (A, B, C) Using BRET² biosensors, the activation of G_q (A), G_{i2} (B) and G_{12} (C) was assessed in HEK293 cells transiently expressing either AT_1R or AT_2R following AngII treatment. (D, E) Using BRET² biosensors, the recruitment of β -arrestin 1 (D), β -arrestin 2 (E) was assessed in HEK293 cells transiently expressing AT_1R , AT_2R receptors following AngII treatment. Data is expressed as mean \pm SEM and represents the mean of 3 independent experiments done in triplicate.

3.4 Impact of exchanging the first intracellular loop between AT₁R and AT₂R on receptor signalling

We assessed the signaling profile of chimeric receptors AT₁(AT₂-ICL1), where the ICL1 of the AT₂R is swapped into AT₁R and AT₂(AT₁-ICL1), where the ICL1 of AT₁R is swapped into AT₂R (Figure 3 and Table 2). Note that both ICL1s have the same length and are positioned identically compared to all conserved motifs and residues (Fig. 1E and Fig. 1F). We found that the AT₁(AT₂-ICL1) chimera did not activate the G_q pathway upon AngII stimulation (Fig. 3A). By contrast, AngII stimulation of the AT₁(AT₂-ICL1) chimera led to the activation of the G_{i2} pathway (Fig. 3B) with a potency of 10.5 nM and an efficacy of 75% when compared to AT₁R, and this effect was blocked by the AT₂R selective antagonist PD123319 (data not shown). As for the G₁₂ pathway (Fig. 3C), AngII stimulation of the AT₁(AT₂-ICL1) chimera showed a reduced potency of 260.2 nM and an efficacy of 53%. Upon evaluation of the β arr pathways, AngII stimulation of AT₁(AT₂-ICL1) exhibited a potency of 16.6 and 2.6 nM as well as an efficacy of 10% and 14% for β arr-1 (Fig. 3D) and β arr-2 (Fig. 3E) respectively. We next examined the signaling properties of the AT₂(AT₁-ICL1) chimeric receptor. Interestingly, this construct activated the G_{i2} pathway with a potency of 3.0 nM and showed an efficacy of 30% compared to AT₁R (Fig. 3B). However, we found that AngII was unable to activate both the G_q and G₁₂ pathways nor to recruit either of the β arrs (Fig. 3A, C, D and E).

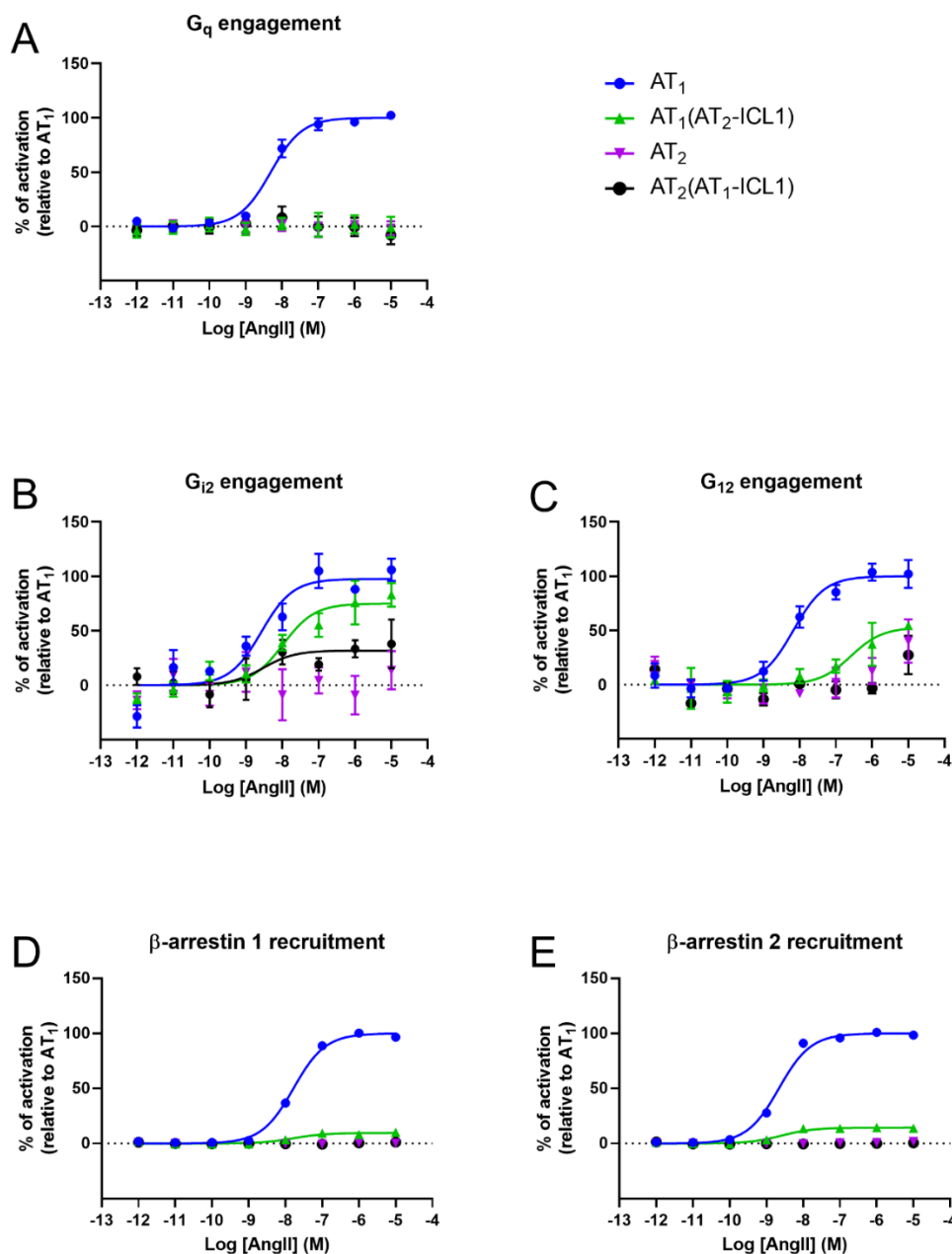


Fig. 3. Activation of G protein and β -arrestin signaling pathways with increasing concentration of AngII for the first intracellular loop chimeric receptors. (A, B, C) Using BRET² biosensors, the activation of G_q (A), G_{i2} (B) and G₁₂ (C) was assessed in HEK293 cells transiently expressing either AT₁R, AT₂R, AT₁(AT₂-ICL1) or AT₂(AT₁-ICL1) following AngII treatment. (D, E) Using BRET² biosensors, the recruitment of β -arrestin 1 (D), β -arrestin 2 (E) was assessed in HEK293 cells transiently expressing either AT₁R, AT₂R, AT₁(AT₂-ICL1) or AT₂(AT₁-ICL1) following AngII treatment. Data is expressed as mean \pm SEM and represents the mean of 3 independent experiments done in triplicate.

Table 2
Activation of G_q, G_{i2}, G₁₂, β arr1 and β arr2 by AT₁R, AT₂R and ICL1 chimeric mutant receptors

	AT ₁		AT ₂		AT ₁ (AT ₂ -ICL1)		AT ₂ (AT ₁ -ICL1)	
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)
G _{q/11}	4.9 ± 0.4	100	-	-	-	-	-	-
G _{i2}	2.6 ± 1.0	100	-	-	10.5 ± 4.0	75 ± 3.9	3.0 ± 5.2	32 ± 4.2
G ₁₂	6.7 ± 1.0	100	-	-	260.2 ± 96.4	53 ± 3.5	-	-
β arr1	16.6 ± 0.9	100	-	-	16.56 ± 3.9	10 ± 0.3	-	-
β arr2	2.19 ± 0.9	100	-	-	2.6 ± 0.3	14 ± 0.3	-	-
IPone	4.3 ± 3.0	100	-	-	6.6 ± 3.0	26 ± 2.4	-	-

Table 2. HEK293 cells expressing the indicated mutants were assayed as described in the methods. EC₅₀ and E_{max} are expressed as the means ± SD of values obtained in at least 3 independent experiments performed in triplicate.

3.5 Impact of exchanging the C-tail between *AT₁R* and *AT₂R* on receptor signalling

Next, we assessed the signaling profile of chimeric receptors *AT₁(AT₂-CT)*, where the C-tail of the *AT₂R* is swapped into the *AT₁R* and *AT₂(AT₁-CT)*, where the C-tail of the *AT₁R* is swapped into the *AT₂R* (Figure 4 and Table 3). Stimulation with AngII of the *AT₁(AT₂-CT)* chimeric receptor produced an increased G_q pathway activation of 183% when compared to *AT₁R* with a potency of 1.89 nM (Fig. 4A). When the G_{i2} pathway was evaluated, AngII activated the *AT₁(AT₂-CT)* chimeric receptor with an increased efficacy of 212% and potency of 1.2 nM (Fig. 4B). For the G_{12} pathway, AngII activated *AT₁(AT₂-CT)* with a potency of 3.8 nM and showed an increased efficacy of 259% when compared to the *AT₁R* (Fig. 4C). By contrast, the *AT₁(AT₂-CT)* chimera recruited β arrrs with a decreased efficacy of 65% and a potency of 15.7 nM for β arr-1 (Fig. 4D) and an efficacy of 86% and a potency of 4.1 nM for β arr-2 (Fig. 4E). Upon evaluation of the signaling pathways of the *AT₂(AT₁-CT)* chimeric receptor, we found that AngII stimulation was unable to produce a dose-dependant response for any pathway tested under our conditions (Fig. 4).

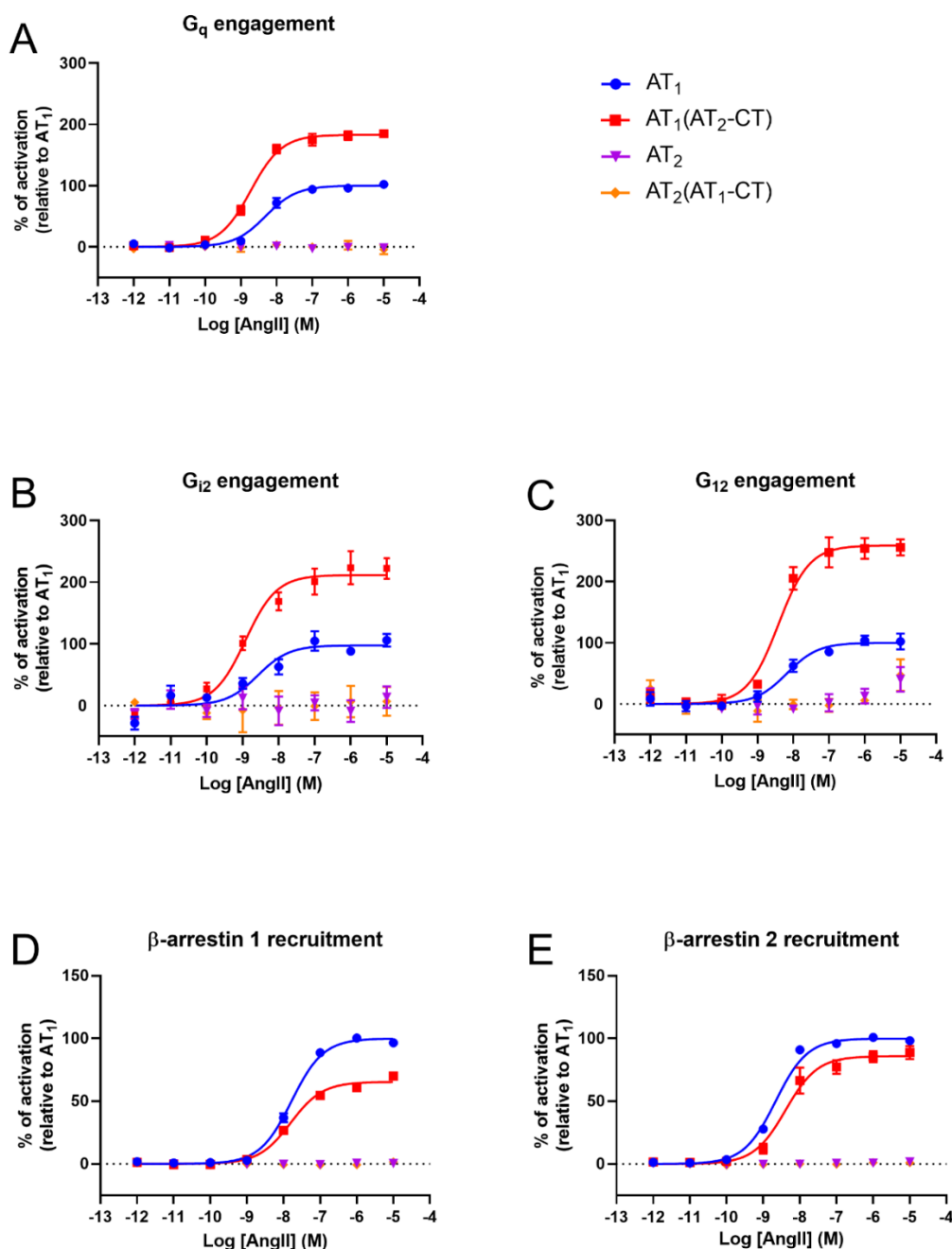


Fig. 4. Activation of G protein and β -arrestin signaling pathways with increasing concentration of AngII for the C-tail chimeric receptors. (A, B, C) Using BRET² biosensors, the activation of G_q (A), G_{i2} (B) and G₁₂ (C) was assessed in HEK293 cells transiently expressing either AT₁R, AT₂R, AT₁(AT₂-CT) or AT₂(AT₁-CT) following AngII treatment. (D, E) Using BRET² biosensors, the recruitment of β -arrestin 1 (D), β -arrestin 2 (E) was assessed in HEK293 cells transiently expressing either AT₁R, AT₂R, AT₁(AT₂-CT) or AT₂(AT₁-CT) following AngII treatment. Data is expressed as mean \pm SEM and represents the mean of 3 independent experiments done in triplicate.

Table 3
Activation of G_q, G_{i2}, G₁₂, β arr1 and β arr2 by AT₁R, AT₂R and C-term chimeric mutant receptors

	AT ₁		AT ₂		AT ₁ (AT ₂ -CT)		AT ₂ (AT ₁ -CT)	
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (% AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%AT ₁)
G _q /11	4.9 ± 0.4	100	-	-	1.9 ± 0.1	183 ± 1.6	-	-
G _{i2}	2.6 ± 1.0	100	-	-	1.2 ± 0.2	212 ± 4.9	-	-
G ₁₂	6.7 ± 1.0	100	-	-	3.83 ± 0.4	259 ± 3.5	-	-
β arr1	16.6 ± 0.9	100	-	-	15.7 ± 3.9	65 ± 0.7	-	-
β arr2	2.19 ± 0.9	100	-	-	4.1 ± 0.5	86 ± 1.24	-	-
IPone	4.3 ± 3.0	100	-	-	1.9 ± 7.9	162.2 ± 5.7	-	-

Table 3. HEK293 cells expressing the indicated mutants were assayed as described in the methods. EC₅₀ and E_{max} are expressed as the means ± SD of values obtained in at least 3 independent experiments performed in triplicate.

3.6 IP_1 production of AT_1 and AT_2 chimeric receptors

In order to validate the results obtained with the G-protein heterotrimer biosensors, we also carried out an assay to measure levels of inositol phosphates linked to activation of G_q . In this assay, dose response curves were obtained in order to measure the IP_1 production and obtain potency and efficacy values for each receptor. For this assay AT_1R was again used as a reference and its efficacy was normalised to 100% and where AngII showed a potency of 5.1 nM (Fig. 5). On the $AT_1(AT_2-ICL1)$ receptor, AngII had a potency of 5.48 nM and an efficacy of 30% (Fig. 5). As for the $AT_1(AT_2-CT)$ showed a potency of 1.90 nM and an efficacy of 151.2% and showed a constitutive activation of 43.5% when compared to AT_1R (Fig. 5). On the other hand, neither AT_2R , $AT_2(AT_1-ICL1)$ or $AT_2(AT_1-CT)$ were able to increase IP_1 levels following AngII stimulation under our conditions (Fig. 5).

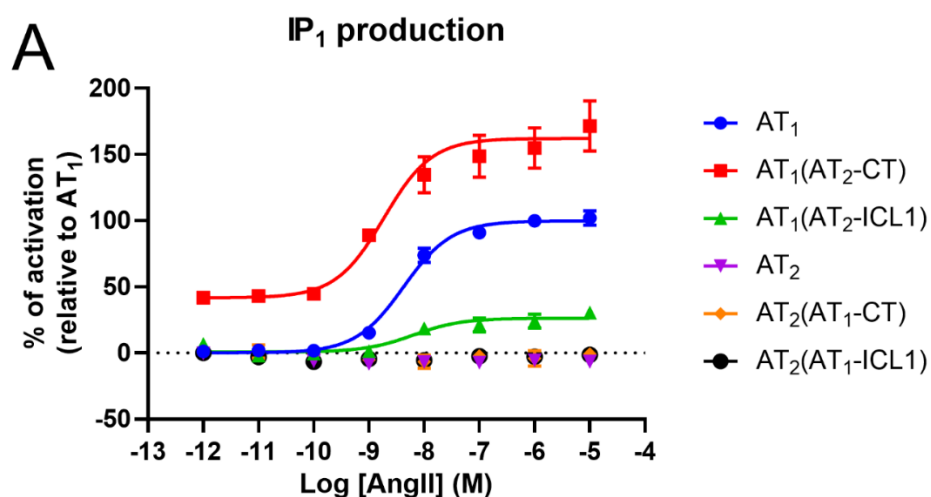


Fig. 5. Second messenger production with increasing concentration of AngII. (A) The production of IP_1 was measured in HEK293 cell transiently expressing either AT_1R , AT_2R , $AT_1(AT_2-ICL1)$, $AT_2(AT_1-ICL1)$, $AT_1(AT_2-CT)$ or $AT_2(AT_1-CT)$ following treatment with increasing concentration of AngII using the IP-One assay. Data is expressed as mean \pm SEM and represents the mean of 3 independent experiments done in triplicate.

4. DISCUSSION

In this study, we report the signaling profile of the AT₁R and AT₂R in HEK293 cells upon AngII stimulation using BRET-based biosensors and examine the impact of the ICL1 and the C-terminal domain of either receptor on their signaling properties using chimeric receptors. Our initial goal was to detect and define AT₂R signaling pathways with a second goal of understanding the molecular mechanisms underlying the lack of observable AT₂R signaling, which we hypothesized was related to the unusual orientation of the AT₂R helix VIII when compared to most class A GPCRs [30].

Although the signaling signature of activated AT₁R is complex, several studies have established that this receptor couples to G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} , G α_i and recruits β -arrestins [6,31,32]. We therefore used AT₁R as a reference of efficacy for the activation of the studied pathways with AT₂R and chimeras. We find that in HEK293 cells, AT₂R is unable under our conditions to activate G $\alpha_{q/11}$, G α_{12} , G α_i or β -arrestins following AngII binding (Figure 2). These observations are consistent with the first report of the crystal structure of AT₂R, that proposed that the atypical positioning of helix VIII in AT₂R would hinder recruitment and activation of G proteins [30] and/or β -arrestins. This contrasts with the positioning of helix VIII in the AT₁R whereby it is speculated that its role would be to assist in recruiting GRKs and β -arrestins [33]. Upon observation of the crystal structures of both AT₁R and AT₂R, we therefore hypothesized that the ICL1 of AT₂R, by virtue of the presence of polar and charged residues, namely Gln72 and Lys73, could be involved in destabilizing interactions with helix VIII and in promoting interaction of this helix with TM6 localized in the vicinity of the effector binding site (Figure 1) and potentially crucial for downstream signaling events.

Swapping the ICL1 in AT₁R for that of AT₂R and *vice versa* generated receptor chimeras AT₁(AT₂-ICL1) and AT₂(AT₁-ICL1). The characterisation of AT₁(AT₂-ICL1) revealed an important loss of function regarding its ability to activate the G α_q pathway as well as recruitment of β -arrestins, which may partially be explained by slightly lower expression levels of this mutant when compared to the wild-type AT₁R. The effects were more modest for the G α_{12} and G α_i pathways with the latter being the least affected pathway, retaining 75% of AT₁R efficacy. Furthermore, the AT₂(AT₁-ICL1) chimera was still unable to activate G α_q and G α_{12} nor was it able to recruit either β -arrestin. However, it did reveal a gain of function regarding its ability to activate the G α_i pathway. It may be argued that being a modified

receptor, AT₂(AT₁-ICL1) might not retain its wild type pathway specificity since other class A GPCRs chimeric constructs exhibited similar behaviors [34,35]. Examples of this were observed with the α_1 -adrenergic (α_1 AR) and β_2 -adrenergic (β_2 -AR) receptors but it is important to stress the fact that this was achieved via ICL3 substitutions and that it has been widely reported that this region is an important determinant for receptor coupling to specific G proteins [34,36]; this seems to also be the case for AT₁R and AT₂R [37,38]. It is important to be cautious interpreting these results but to our knowledge ICL1 has not been shown to be a major determining factor in G protein-coupling specificity. Furthermore, it may be argued that since AT₂R has been shown to immunoprecipitate with G α_{i2} , as well as having PTX sensitive signalling, AT₂(AT₁-ICL1) could have retained AT₂R's original signalling specificity. One interpretation is that the absence of polar residue Gln72 and the positive charge provided by the adjacent residue Lys73 in the ICL1 of AT₂(AT₁-ICL1) compared to that of AT₂R allows for an 'AT₁R-like' stabilisation of helix VIII by ICL1, thus favoring a rescue of the coupling and activation of G α_{i2} in a ligand-dependent manner.

In a second set of experiments we exchanged the C-terminal domains between the receptors generating receptor chimeras AT₁(AT₂-CT) and AT₂(AT₁-CT). Although AT₂(AT₁-CT) did not exhibit any significant differences when compared to AT₂R when stimulated with AngII under our conditions, we demonstrate that the AT₁(AT₂-CT) chimera could signal in every pathway tested. Indeed, swapping the AT₂R C-terminal domain into the AT₁R led to an increase of efficacy of all the examined G protein pathways and a decrease in the efficacy of β -arr recruitment. It has been previously shown with similar chimeras of AT₁R with modified C-tails that these receptors do indeed retain their ability to activate signaling pathways such as increasing calcium release upon stimulation and IP₃ production [39,40]. These results suggest that helix VIII of AT₂R is compatible with canonical class A GPCR signaling and support the idea that it would not itself be the underlying cause for AT₂R's atypicality. It is also important to stress the fact that AT₁(AT₂-CT) not only activated G protein pathways, it did so with increased efficacy. To explain this result, it might be argued that 1) increased B_{max} values of this construct promotes increased BRET values (although this was not observed for β -arr recruitment) or 2) AT₁(AT₂-CT) could have reduced stability in its inactive state and in turn this would facilitate activation or even stabilise its active form as is suggested by the AT₂R structure [30].

Lastly, we report inositol phosphate production by each receptor. It has been widely established that the AT₁R has been shown to favor signaling through G $\alpha_{q/11}$ -PLC β -PKC in HEK293 cells [1,2,6,31]. We found that, although AT₁(AT₂-ICL1) did not activate G α_q using the BRET biosensor assay, it showed a greatly reduced but measurable levels of IP₁. One explanation for this discrepancy between G α_q activation and IP₁ production may be that the AT₂R ICL1 domain is pushing helix VIII towards AT₁R's TM6 and this hinders G α_q activation but not activation of other G proteins. Hence this would indicate that the other G proteins could interact at a slightly different site of AT₂R to be activated. Since this receptor activates G α_{i2} , it may be possible that AT₁(AT₂-ICL1) uses the aforementioned pathway to activate PLC through G $\beta\gamma$ subunits released from G α_i heterotrimers [41]. As for AT₁(AT₂-CT), it exhibited increased G protein efficacy compared to AT₁R using the BRET biosensor assay and this is also the case of IP₁ production. Interestingly, AT₁(AT₂-CT), upon AngII stimulation, also showed a higher basal IP₁ production of 50% of the AT₁R maxima. This suggests that the AT₂R C-tail could play a role in modulating AT₁(AT₂-CT) receptor activation, perhaps through a modified spatial orientation which could lead to a greater propensity to activate in its basal state. Indeed, the AT₂R structure reported by Zhang *et al.* suggests that helix VIII stabilises the receptor in its active state when positioned inward towards their binding pocket and interacts with helix III, V and VI [30].

Taken together, our results suggest that the underlying cause for the lack of canonical signaling in AT₂R would be due, not to the residues that compose helix VIII or the C-terminal domain of the AT₂R, but rather to the increased polarity in its ICL1 that leads to the observed atypical conformation of helix VIII observed in the AT₂R structure [30]. Altogether, our results demonstrate that both the ICL1 and C-tail of AT₂R are important structural determinants of AT₂R and confer unique characteristics to receptors when substituted to form chimeras in receptors of the same family. This opens up new possibilities for the continued efforts to better understand the still enigmatic AT₂R and further our understanding of the intricacies of GPCR signaling.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research [MOP-136770] to PL and RL.

REFERENCES

- [1] M. de Gasparo, K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, T. Unger, International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors., *Pharmacol. Rev.* 52 (2000) 415–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977869>.
- [2] S.S. Karnik, H. Unal, J.R. Kemp, K.C. Tirupula, S. Eguchi, P.M.L. Vanderheyden, W.G. Thomas, Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli, *Pharmacol. Rev.* 67 (2015) 754–819. doi:10.1124/pr.114.010454.
- [3] S.J. Forrester, G.W. Booz, C.D. Sigmund, T.M. Coffman, T. Kawai, V. Rizzo, R. Scalia, S. Eguchi, Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology., *Physiol. Rev.* 98 (2018) 1627–1738. doi:10.1152/physrev.00038.2017.
- [4] L. Hunyady, K.J. Catt, Pleiotropic AT 1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II, *Mol. Endocrinol.* 20 (2005) 953–970. doi:10.1210/me.2004-0536.
- [5] S. Siehler, Regulation of RhoGEF proteins by G 12/13 -coupled receptors, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 41–49. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00121.x.
- [6] Y. Namkung, C. LeGouill, S. Kumar, Y. Cao, L.B. Teixeira, V. Lukasheva, J. Giubilaro, S.C. Simões, J.-M. Longpré, D. Devost, T.E. Hébert, G. Piñeyro, R. Leduc, C.M. Costa-Neto, M. Bouvier, S.A. Laporte, Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors, *Sci. Signal.* 11 (2018) eaat1631. doi:10.1126/scisignal.aat1631.
- [7] J. Zhang, L.S. Barak, P.H. Anborgh, S.A. Laporte, M.G. Caron, S.S. Ferguson, Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10999–1006. doi:10.1074/JBC.274.16.10999.
- [8] R.J. Lefkowitz, E.J. Whalen, β -arrestins: traffic cops of cell signaling, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 162–168. doi:10.1016/J.CEB.2004.01.001.
- [9] L.M. Luttrell, Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (2002) 375–382. doi:10.1139/y02-045.
- [10] Y. Oishi, R. Ozono, Y. Yano, Y. Teranishi, M. Akishita, M. Horiuchi, T. Oshima, M. Kambe, Cardioprotective Role of AT₂ Receptor in Postinfarction Left Ventricular Remodeling, *Hypertension.* 41 (2003) 814–818. doi:10.1161/01.HYP.0000048340.53100.43.

- [11] Y. Tsutsumi, H. Matsubara, H. Masaki, H. Kurihara, S. Murasawa, S. Takai, M. Miyazaki, Y. Nozawa, R. Ozono, K. Nakagawa, T. Miwa, N. Kawada, Y. Mori, Y. Shibasaki, Y. Tanaka, S. Fujiyama, Y. Koyama, A. Fujiyama, H. Takahashi, T. Iwasaka, Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation., *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 925–35. doi:10.1172/JCI7886.
- [12] M. Stoll, U.M. Steckelings, M. Paul, S.P. Bottari, R. Metzger, T. Unger, The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells., *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 651–7. doi:10.1172/JCI117710.
- [13] U.M. Steckelings, R.E. Widdop, L. Paulis, T. Unger, The angiotensin AT2 receptor in left ventricular hypertrophy, *J.Hypertens.* 28 Suppl 1 (2010) S50–S55.
- [14] C. Savoia, R.M. Touyz, M. Volpe, E.L. Schiffrin, Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients, *Hypertension.* 49 (2007) 341–346. doi:10.1161/01.HYP.0000253968.95136.b8.
- [15] C. Savoia, R.M. Touyz, M. Volpe, E.L. Schiffrin, Angiotensin Type 2 Receptor in Resistance Arteries of Type 2 Diabetic Hypertensive Patients, *Hypertension.* 49 (2007) 341–346. doi:10.1161/01.HYP.0000253968.95136.b8.
- [16] S. Leblanc, M.-C. Battista, C. Noll, A. Hallberg, N. Gallo-Payet, A.C. Carpentier, D.F. Vine, J.-P. Baillargeon, Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Improves Fatty Acid Ovarian Uptake and Hyperandrogenemia in an Obese Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome, *Endocrinology.* 155 (2014) 3684–3693. doi:10.1210/en.2014-1185.
- [17] A. Pandey, A.B. Gaikwad, AT2 receptor agonist Compound 21: A silver lining for diabetic nephropathy, *Eur. J. Pharmacol.* 815 (2017) 251–257. doi:10.1016/J.EJP.2017.09.036.
- [18] K.H. Leung, W.A. Roscoe, R.D. Smith, P.B. Timmermans, A.T. Chiu, Characterization of biochemical responses of angiotensin II (AT2) binding sites in the rat pheochromocytoma PC12W cells., *Eur. J. Pharmacol.* 227 (1992) 63–70. doi:10.1016/0922-4106(92)90143-j.
- [19] M.L. Webb, E.C. Liu, R.B. Cohen, A. Hedberg, E.A. Bogosian, H. Monshizadegan, C. Molloy, R. Serafino, S. Moreland, T.J. Murphy, Molecular characterization of angiotensin II type II receptors in rat pheochromocytoma cells., *Peptides.* 13 (n.d.) 499–508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326103> (accessed February 20, 2017).
- [20] J. Zhang, R.E. Pratt, The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15026–15033. doi:10.1074/JBC.271.25.15026.

- [21] L. Gendron, F. Côté, M.D. Payet, N. Gallo-Payet, F. Cote, M.D. Payet, N. Gallo-Payet, Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT2 receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells, *Neuroendocrinology*. 75 (2002) 70–81. doi:10.1159/000048222.
- [22] K. Bedecs, N. Elbaz, M. Sutren, M. Masson, C. Susini, A.D. Strosberg, C. Nahmias, Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase., *Biochem. J.* 325 (Pt 2 (1997) 449–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230127> (accessed February 20, 2017).
- [23] T.A. Fischer, K. Singh, D.S. O'Hara, D.M. Kaye, R.A. Kelly, Role of AT 1 and AT 2 receptors in regulation of MAPKs and MKP-1 by ANG II in adult cardiac myocytes, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 275 (1998) H906–H916. doi:10.1152/ajpheart.1998.275.3.H906.
- [24] M. Zhu, C.H. Gelband, J.M. Moore, P. Posner, C. Sumners, Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid., *J. Neurosci.* 18 (1998) 679–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-02-00679.1998.
- [25] M.-O. Guimond, N. Gallo-Payet, How does angiotensin AT(2) receptor activation help neuronal differentiation and improve neuronal pathological situations?, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3 (2012) 164. doi:10.3389/fendo.2012.00164.
- [26] J.A. Olivares-Reyes, S. Jayadev, L. Hunyady, K.J. Catt, R.D. Smith, Homologous and heterologous phosphorylation of the AT(2) angiotensin receptor by protein kinase C., *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 1156–61. doi:10.1124/mol.58.5.1156.
- [27] G. Turu, L. Szidonya, Z. Gáborik, L. Buday, A. Spät, A.J.L. Clark, L. Hunyady, Differential beta-arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors., *FEBS Lett.* 580 (2006) 41–5. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.044.
- [28] P.J. Fraker, J.C. Speck, Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 (1978) 849–857. doi:10.1016/0006-291X(78)91322-0.
- [29] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3389–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694> (accessed April 25, 2019).
- [30] H. Zhang, G.W. Han, A. Batyuk, A. Ishchenko, K.L. White, N. Patel, A. Sadybekov, B. Zamlenny, M.T. Rudd, K. Hollenstein, A. Tolstikova, T.A. White, M.S. Hunter, U. Weierstall, W. Liu, K. Babaoglu, E.L. Moore, R.D. Katz, J.M. Shipman, M. Garcia-Calvo, S. Sharma, P. Sheth, S.M. Soisson, R.C. Stevens, V. Katritch, V. Cherezov,

- Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors, *Nature*. 544 (2017) 327–332. doi:10.1038/nature22035.
- [31] D. St-Pierre, J. Cabana, B.J. Holleran, É. Besserer-Offroy, E. Escher, G. Guillemette, P. Lavigne, R. Leduc, Angiotensin II cyclic analogs as tools to investigate AT1R biased signaling mechanisms., *Biochem. Pharmacol.* 154 (2018) 104–117. doi:10.1016/j.bcp.2018.04.021.
 - [32] I. Domazet, B.J. Holleran, A. Richard, C. Vandenberghe, P. Lavigne, E. Escher, R. Leduc, G. Guillemette, Characterization of Angiotensin II Molecular Determinants Involved in AT1 Receptor Functional Selectivity, *Mol. Pharmacol.* 87 (2015) 982–995. doi:10.1124/mol.114.097337.
 - [33] L.M. Wingler, M. Elgeti, D. Hilger, N.R. Latorraca, M.T. Lerch, D.P. Staus, R.O. Dror, B.K. Kobilka, W.L. Hubbell, R.J. Lefkowitz, Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations., *Cell*. 176 (2019) 468–478.e11. doi:10.1016/j.cell.2018.12.005.
 - [34] S. Cotecchia, S. Exum, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz, Regions of the alpha 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 2896–900. doi:10.1073/PNAS.87.8.2896.
 - [35] R. Chakraborty, S.P. Pydi, S. Gleim, R.P. Bhullar, J. Hwa, S. Dakshinamurti, P. Chelikani, New insights into structural determinants for prostanoid thromboxane A2 receptor- and prostacyclin receptor-G protein coupling., *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 184–93. doi:10.1128/MCB.00725-12.
 - [36] R.J. Lefkowitz, Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 413–422. doi:10.1016/j.tips.2004.06.006.
 - [37] W. Hayashida, M. Horiuchi, V.J. Dzau, Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor: Role in mediating signal transduction and cellular function, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21985–21992. doi:10.1074/jbc.271.36.21985.
 - [38] L. Daviet, J.Y.A. Lehtonen, W. Hayashida, V.J. Dzau, M. Horiuchi, Intracellular third loops in AT1 and AT2 receptors determine subtype specificity, *Life Sci.* 69 (2001) 509–516. doi:10.1016/S0024-3205(01)01144-4.
 - [39] ‡ John Hines, ¶ and Steven J. Fluharty, ‡,§, § Daniel K. Yee*, Chimeric AT1/AT2 Receptors Reveal Functional Similarities Despite Key Amino Acid Dissimilarities in the Domains Mediating Agonist-Dependent Activation†, (2001). doi:10.1021/BI002780U.

- [40] C. Wang, S. Jayadev, J.A. Escobedo, Identification of a Domain in the Angiotensin II Type 1 Receptor Determining G q Coupling by the Use of Receptor Chimeras, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16677–16682. doi:10.1074/jbc.270.28.16677.
- [41] A. V Smrcka, G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling., *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2191–214. doi:10.1007/s00018-008-8006-5.

MATÉRIEL ET MÉTHODES (HORS ARTICLE)

4.1 Modification du protocole pour les essais de BRET

4.1.1 Mesure de l'évolution dans le temps de l'activation des voies dépendantes des protéines G par BRET.

L'ensemble des expériences de BRET a été effectué suivant le protocole décrit dans l'article inclus dans ce mémoire hormis une exception : les essais ont été réalisés de façon à mesurer l'évolution de l'activation des voies de signalisation dans le temps à la suite d'une stimulation avec une dose saturante d'agoniste. Les cellules sont stimulées avec les ligands à une concentration de 1 μ M. Les ligands utilisés sont l'AngII, le C21 (ligand sélectif pour AT₂), le U46619 (agoniste pour le récepteur TP α) et la nociceptine (agoniste pour le récepteur OPRL1). À la suite de la stimulation des cellules, l'évolution du ratio de BRET est mesurée dans le temps pour une durée de 15 minutes.

4.2 Induction de l'élongation des neurites dans les cellules NG108-15 par une stimulation du récepteur AT₂

Le protocole utilisé pour cette expérience est décrit en détail dans la littérature (Laflamme et Gallo-Payet, 1996). En bref, les cellules NG108-15 ont étéensemencées à une densité de 30,000 cellules/pétri 35mm et ont été cultivées pendant 72h avec ou sans stimulation (C21 100nM ou AngII 100nM), et ce, en présence ou non de PD123319 10 μ M (un antagoniste AT₂). La stimulation des cellules par les agonistes induit une différenciation cellulaire caractérisée par une élongation des neurites. Si une cellule possède un neurite dont la longueur est plus importante que le diamètre de cette même cellule, elle est considérée comme étant en différenciation.

4.3 Analyse du phosphoprotéome

4.3.1 Préparation des échantillons.

Des cellules HEK293 ont été maintenues dans un milieu DMEM (supplémenté avec 10% de FBS, 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine) à 37 °C dans une atmosphère 5% CO₂ humidifiée. Les cellules HEK293 (3×10^6 cellules/pétri de 100 mm) ont été transfectées de manière transitoire avec le récepteur AT₂ (3 000 ng) en utilisant du polyéthylèneimine (PEI) comme agent de transfection (employant un rapport PEI pour ADN de 4:1). À 48h post transfection, les cellules ont été stimulées avec 100 nM d'AngII (ou avec véhicule) pour 5 minutes. Les cellules ont ensuite été placées sur glace, le milieu a été substitué avec un tampon d'extraction (urée 9M, tris 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, cocktails d'inhibiteurs des protéases (cOmplete™, Sigma) et des inhibiteurs de phosphatases (PhosSTOP™, Sigma)) et récolté. Les échantillons, toujours gardés sur glace ou réfrigérés à 4°C, ont par la suite été placés 1h sur roue, soniqués et finalement centrifugés. Le surnageant a ensuite été récupéré, dosé par BCA (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) et congelé à -80°C. L'expérience a été exécutée 3 fois de façon indépendante, chacune effectuée en triplicata.

4.3.2 Analyses phosphoprotéomiques des échantillons.

Les échantillons ont été analysés sans enrichissement et après enrichissement sur colonne TiO₂. Pour cela, ils ont été analysés en ligne en utilisant une HPLC nano débit (nlc 1200, Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse ayant une source nanoelectrospray (QExactive HF-X, Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été séparés sur une colonne capillaire (phase inverse C18, NanoViper, Dionex) suivant un gradient de 0-40% de B en 90 min (run de 120 min) (A = 0,1% acide formique ; B = 0.1 % acide formique dans 80% acetonitrile) à un débit de 300 nL/min. Les spectres ont été enregistrés via le logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Ces appareils sont contrôlés régulièrement (nettoyage, fluides, calibration). Nous avons utilisé comme bases de données : RefProteome_HUMAN-cano_2018_04.fasta (source UniprotKB) et contaminants_fpp_180320.fasta avec les modifications suivantes : Carbamidomethylation (C) en fixe et Oxydation (M), Acetyl (Protein N-term) et Phospho (STY) en modifications variables. Pour les échantillons de départ non enrichis (input), les données spectrales ont été

analysées via les logiciels MaxQuant 1.5.5.1, script FPP leading v3.2 et Perseus v1.6.1.1. Pour les échantillons enrichis (TiO₂), les données spectrales ont été analysées via les logiciels MaxQuant 1.5.5.1, Perseus v1.6.1.1 et Skyline V4.1. L'ensemble des analyses phosphoprotéomiques des échantillons ont été réalisées par l'équipe du Dr. Philippe Marin à l'institut de génomique fonctionnelle de l'université de Montpellier.

RÉSULTATS (HORS ARTICLE)

Dans l'article présenté à la section 3 du présent document, nous avons d'abord caractérisé la capacité des récepteurs AT₁ et AT₂ de type sauvage à coupler et à activer diverses voies de signalisation associées aux protéines G et aux β arr, et ce, à l'aide d'essais utilisant des biosenseurs BRET. Toutefois, ces résultats n'incluent pas l'ensemble des voies associées aux protéines G. Les voies de signalisation d'AT₂ n'étant toujours pas clairement établies, l'ensemble des biosenseurs des voies de signalisation dépendantes des protéines G accessibles aux GPCR seront présentées dans cette section. De plus, certains des résultats obtenus avec les cellules NG108-15 et l'effet de la stimulation du récepteur AT₂ sur l'élongation des neurites seront présentés dans cette section.

En dernier lieu, les résultats de mon deuxième projet, la caractérisation signalétique d'AT₂ par analyse quantitative du phosphoprotéome, seront aussi présentés dans cette section. Ce projet avait comme objectif d'identifier les événements de phosphorylation modulés par le récepteur AT₂, ainsi qu'obtenir une compréhension plus large des mécanismes de signalisation d'AT₂ et des voies de signalisation lui étant associés.

5.1 Activation des protéines G par le récepteur AT₂

5.1.1 Activation de la voie G_q

En utilisant des récepteurs dont la capacité à activer certaines voies de signalisation précise comme contrôle positif, il a été possible de comparer l'activation des biosenseurs, par ces récepteurs contrôles, à celle du récepteur AT₂. Par exemple, largement caractérisé à ce jour, le récepteur AT₁ a été choisi comme contrôle positif pour la voie de signalisation G_q. L'activation d'une voie de protéine G donnée a été vérifiée lorsque le rapport de BRET diminuait à la suite de la dissociation des sous-unités G α -RlucII et G γ -GFP.

Nous avons d'abord évalué l'activation de la voie G_q en soumettant AT₁ et AT₂ à une dose saturante d'AngII ou de C21 dans le cas d'AT₂ (Figure 5). La stimulation du récepteur AT₁ engendre une activation caractérisée par l'obtention d'un Δ BRET de 0.16

comparativement à l'utilisation du véhicule. Toutefois, aucune activation n'est détectable suite à l'exposition du récepteur AT₂ à l'AngII 1μM ou au C21 1μM.

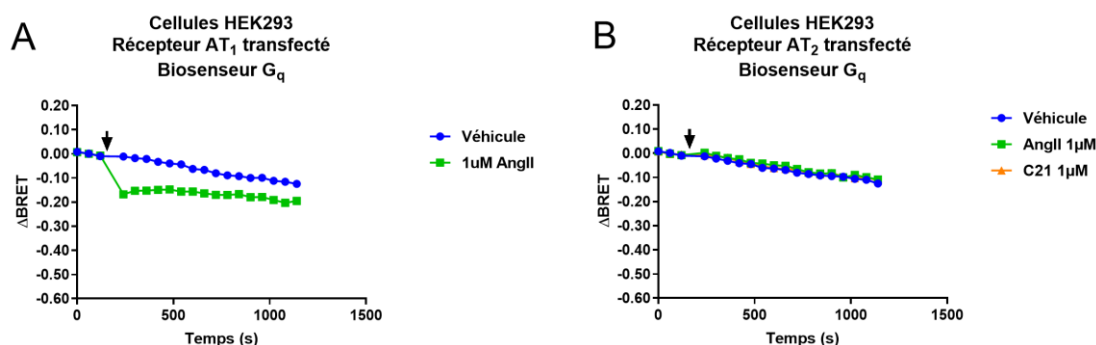


Figure 5. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G_q mesurée par BRET. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le récepteur AT₁ (A) ou AT₂ (B) et le biosenseur G_q (comme décrit précédemment dans l'article). La stimulation est indiquée par la flèche noire. Chaque ensemble de données est exprimé par la moyenne ± S.E.M et est fait en triplicata.

5.1.2 Activation des voies G_{12/13}

L'activation des voies G_{12/13} (Figure 6) a été évalué. Pour ces voies de signalisation, le récepteur TPα a été utilisé comme contrôle positif. Suite à la stimulation du récepteur TPα avec son agoniste l'U46619 1μM, il a été possible de mesurer une activation dont le ΔBRET s'élevait à 0.38 pour la voie G₁₂ (Figure 6 A) et à 0.26 pour la voie G₁₃ (Figure 6 C) comparativement au véhicule. Toutefois, aucune activation des voies G₁₂ ou G₁₃ n'a été détectée à la suite de l'exposition du récepteur AT₂ à l'AngII 1μM ou au C21 1μM (Figure 6 B et D).

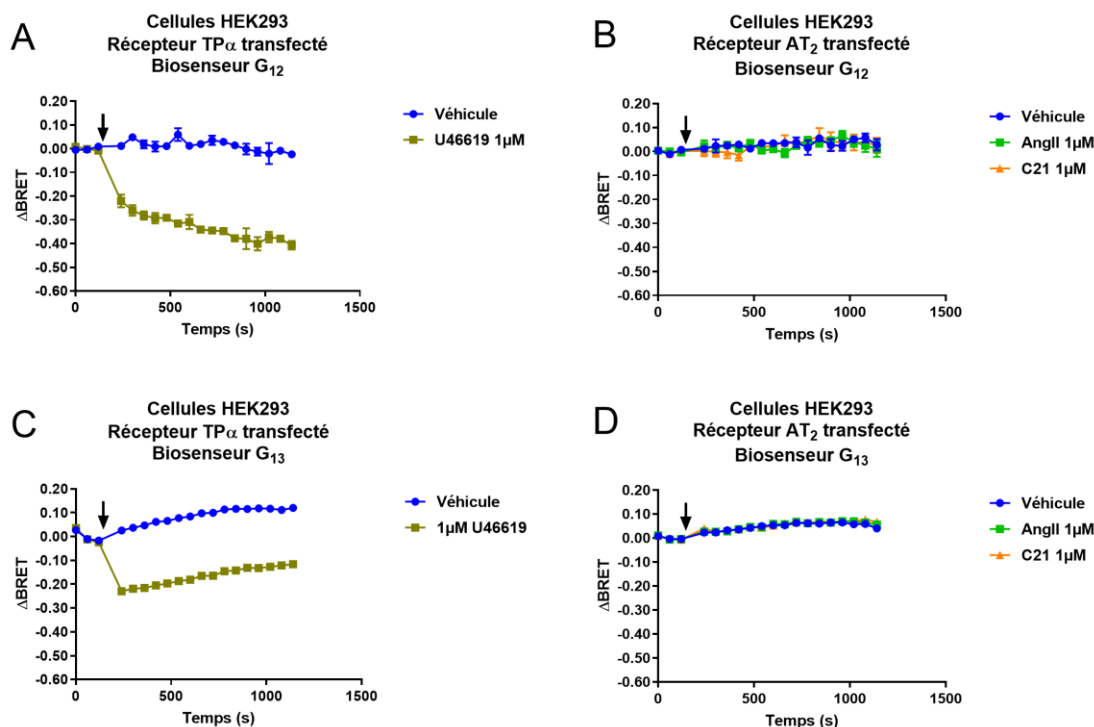


Figure 6. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G₁₂ (A, B) et G₁₃ (C, D) mesurée par BRET. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le récepteur TP α (A, C) ou AT₂ (B, D) et le biosenseur G₁₂ ou G₁₃ (comme décrit précédemment dans l'article). La stimulation est indiquée par la flèche noire. Chaque ensemble de données est exprimé par la moyenne \pm S.E.M et est fait en triplicata.

5.1.3 Activation des voies de la famille G_i

En ce qui concerne l'évaluation de l'activation des voies de la famille des G_i (Figure 7, Figure 8) le récepteur OPRL1 a été utilisé comme contrôle positif. La stimulation du récepteur OPRL1 avec la nociceptine (1 μ M), un agoniste pour ce récepteur, a engendré l'activation de toutes les voies de la famille G_i. Il a alors été possible de mesurer une activation sous forme de Δ BRET pour l'ensemble des voies de la famille des G_i : un Δ BRET, comparativement au véhicule, de 0.12 pour la voie G_{i1} (Figure 7 A), de 0.10 pour la voie G_{i2} (Figure 7 C), de 0.13 pour la voie G_{i3} (Figure 7 E), de 0.05 pour la voie G_z (Figure 8 A), de 0.06 pour la voie G_{oA} (Figure 8 C) et de 0.07 pour la voie G_{oB} (Figure 8 E). Cependant, aucune activation n'a été détectée à la suite de l'exposition du récepteur AT₂ à l'AngII 1 μ M ou au C21 1 μ M pour ces voies de signalisation (Figure 7 B, D, F et Figure 8 B, D, F). Somme toute, le récepteur AT₂, à la suite d'une stimulation avec une dose saturante d'AngII, est

incapable d'induire, dans ces conditions, une activation ligand-dépendante des voies associées aux protéines G.

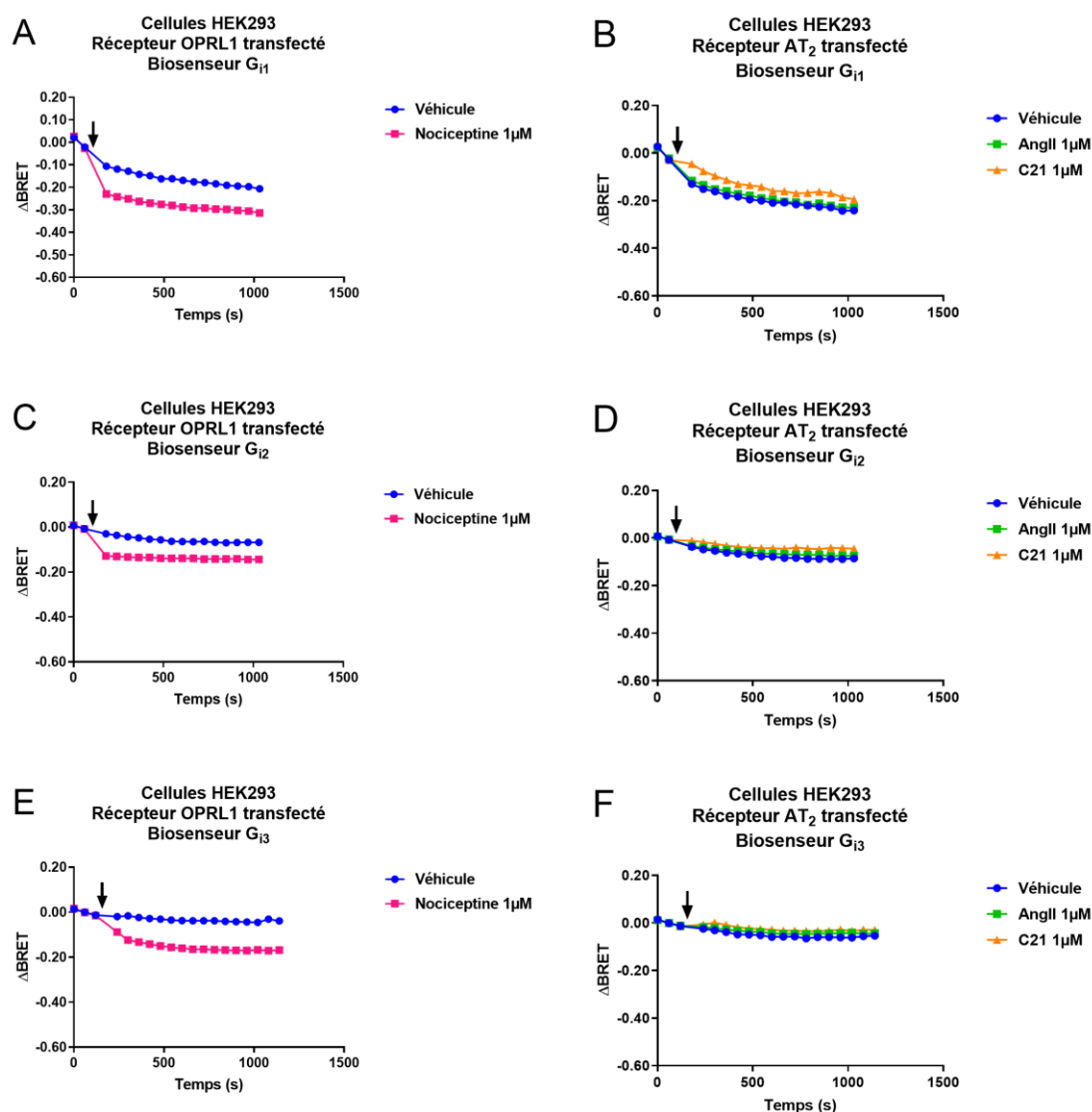


Figure 7. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G_{i1} (A, B), G_{i2} (C, D) et G_{i3} (E, F) mesurée par BRET. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le récepteur OPRL1 (A, C, E) ou AT_2 (B, D, F) et le biosenseur G_{i1} , G_{i2} ou i_3 (comme décrit précédemment dans l'article). La stimulation est indiquée par la flèche noire. Chaque ensemble de données est exprimé par la moyenne \pm S.E.M et est fait en triplicata.

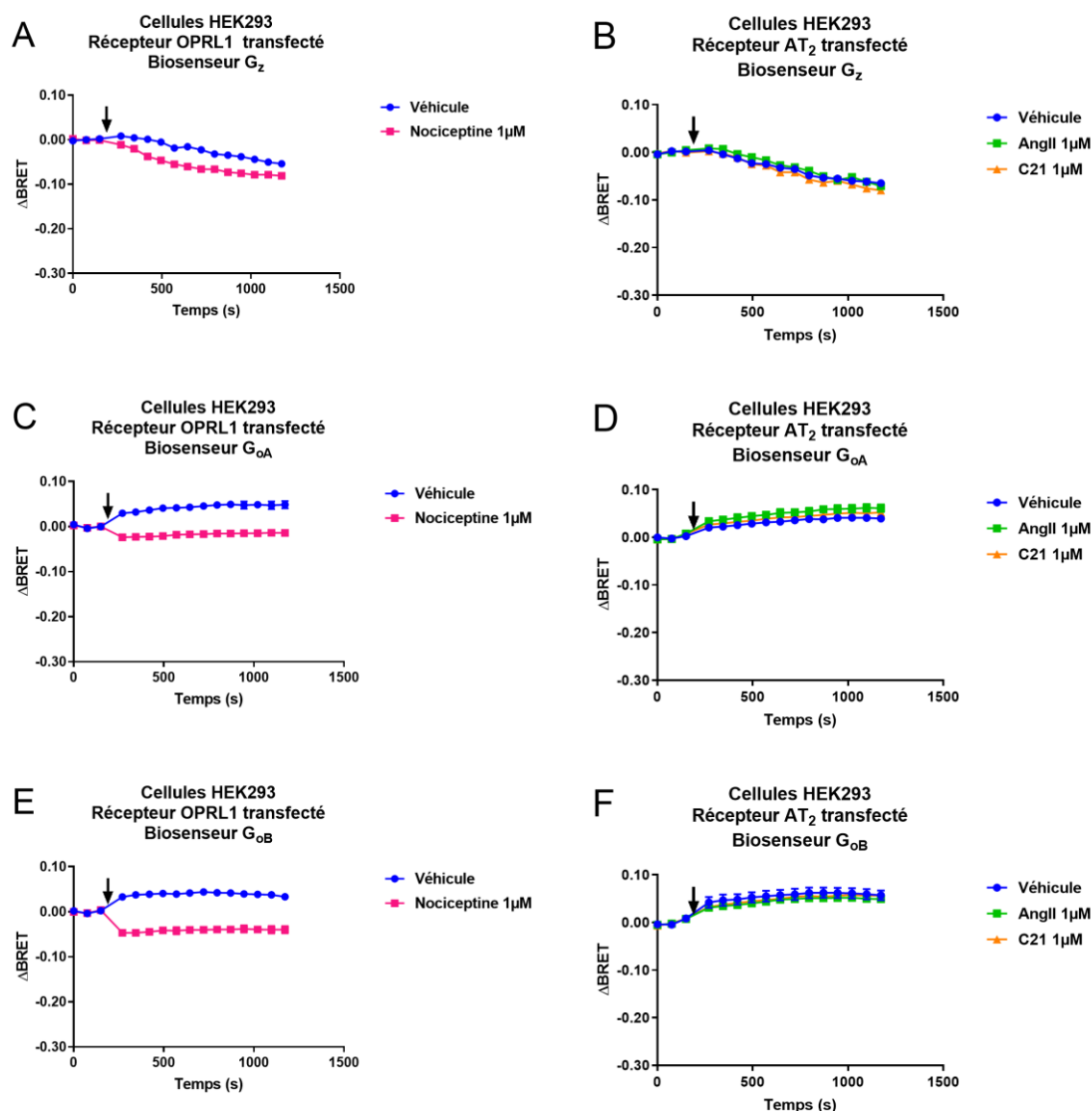


Figure 8. Évolution dans le temps de l'activation de la voie G_z (A, B), G_{oA} (C, D) et G_{oB} (E, F) mesurée par BRET. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le récepteur OPRL1 (A, C, E) ou AT_2 (B, D, F) et le biosenseur G_z , G_{oA} ou G_{oB} (comme décrit précédemment dans l'article). La stimulation est indiquée par la flèche noire. Chaque ensemble de données est exprimé par la moyenne \pm S.E.M et est fait en triplicata.

5.2 Modulation des niveaux d'AMPc par les récepteurs angiotensinergiques et leurs chimères.

Utilisant le biosenseur EPAC, basé sur la protéine *Exchange Factor Directly Activated by cAMP*, il a été possible d'évaluer l'effet des récepteurs AT₁ et AT₂, ainsi que des différentes chimères sur les niveaux d'AMPc intracellulaires. En effet, à la suite de la liaison de l'AMPc au biosenseur, EPAC subit un changement conformationnel menant à une diminution du ratio BRET. En bref, une diminution du ratio BRET indique une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc. Utilisant les cellules HEK293 surexprimant uniquement le biosenseur EPAC (Figure 9 A) comme référence, il est possible d'observer une baisse du ratio BRET de 0.07 à la suite de la stimulation avec la forskoline (Fsk) (1µM) puisque cette dernière active la production d'AMPc. La stimulation avec l'AngII (1µM) n'induit aucun changement comparativement au véhicule et il en va de même avec la costimulation Fsk + AngII comparativement à Fsk seul. Le récepteur OPRL1 (Figure 9 B) est utilisé comme contrôle positif pour une réponse de type G_i. Étant couplé aux protéines G_i, le récepteur OPRL1, suite à son activation par la nociceptine (1µM), inhibe la hausse d'AMPc induite par la Fsk. La stimulation avec la Fsk des cellules exprimant OPRL1, ainsi que le biosenseur EPAC, induit une baisse du ratio BRET de 0.07, mais lors de la costimulation Fsk + nociceptine (1µM) aucun changement dans le ratio de BRET n'est perçu. Le récepteur AT₁ (Figure 9 C) quant à lui, montre un profil de réponse similaire aux cellules ne surexprimant aucun récepteur avec une baisse du ratio BRET de 0.07 à la suite d'une stimulation avec la Fsk (1µM). La stimulation de ces cellules avec l'AngII (1µM) n'a aucun effet apparent sur les niveaux d'AMPc. D'un autre côté, le récepteur AT₂ présente un profil de réponse intéressant (Figure 9 D). En effet, aucun des traitements, n'y même la Fsk (1µM), n'a réussi à induire un changement de BRET. L'expression du récepteur AT₂ dans les cellules HEK293 est donc suffisante, à elle seule, de façon ligand-indépendante, pour empêcher l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaires. Quant aux chimères (les mêmes que dans l'article présenté à la section 3), il est possible de constater que le récepteur AT₁(AT₂-ICL1) (Figure 9 E) a un profil signalétique similaire à celui du récepteur AT₁ de type sauvage avec une baisse du ratio BRET de 0.07, suite à une stimulation avec la Fsk (1µM). Aucune réponse n'est détectée avec une stimulation avec l'AngII (1µM). Cependant, la substitution de la queue C-terminale présente dans le récepteur AT₁(AT₂-CT) (Figure 9 G) induit une

multitude de changements. La stimulation de la chimère AT₁(AT₂-CT) avec la Fsk (1μM) induit une baisse du ratio BRET de 0.08, similaire au récepteur AT₁. Toutefois, il est maintenant possible de constater qu'avec le récepteur AT₁(AT₂-CT), une stimulation avec l'AngII seule, induit une baisse du ratio BRET de 0.04 : témoignant d'une hausse des niveaux intracellulaires d'AMPC. De plus, l'effet de l'AngII sur cette chimère est aussi présent lors de la costimulation Fsk et AngII avec une baisse du BRET ratio de 0.14. Finalement, les chimères issues du récepteur AT₂ ont elles aussi présenté des profils de réponse intéressante. La chimère AT₂(AT₁-ICL1) (Figure 9 F), de façon similaire au récepteur AT₁, présente une baisse de ratio BRET, ici de 0.08, à la suite d'une stimulation avec la Fsk (1μM). La substitution de l'ICL1 a donc engendré la perte de l'activité constitutive présente avec le récepteur AT₂ sauvage. Toutefois, le changement de la queue C-terminale dans le récepteur AT₂, présent dans la chimère AT₂(AT₁-CT) (Figure 9 H), ne semble pas changer les propriétés du récepteur AT₂ puisqu'il inhibe toujours l'effet de la Fsk (1μM), et ce, de façon ligand-indépendante.

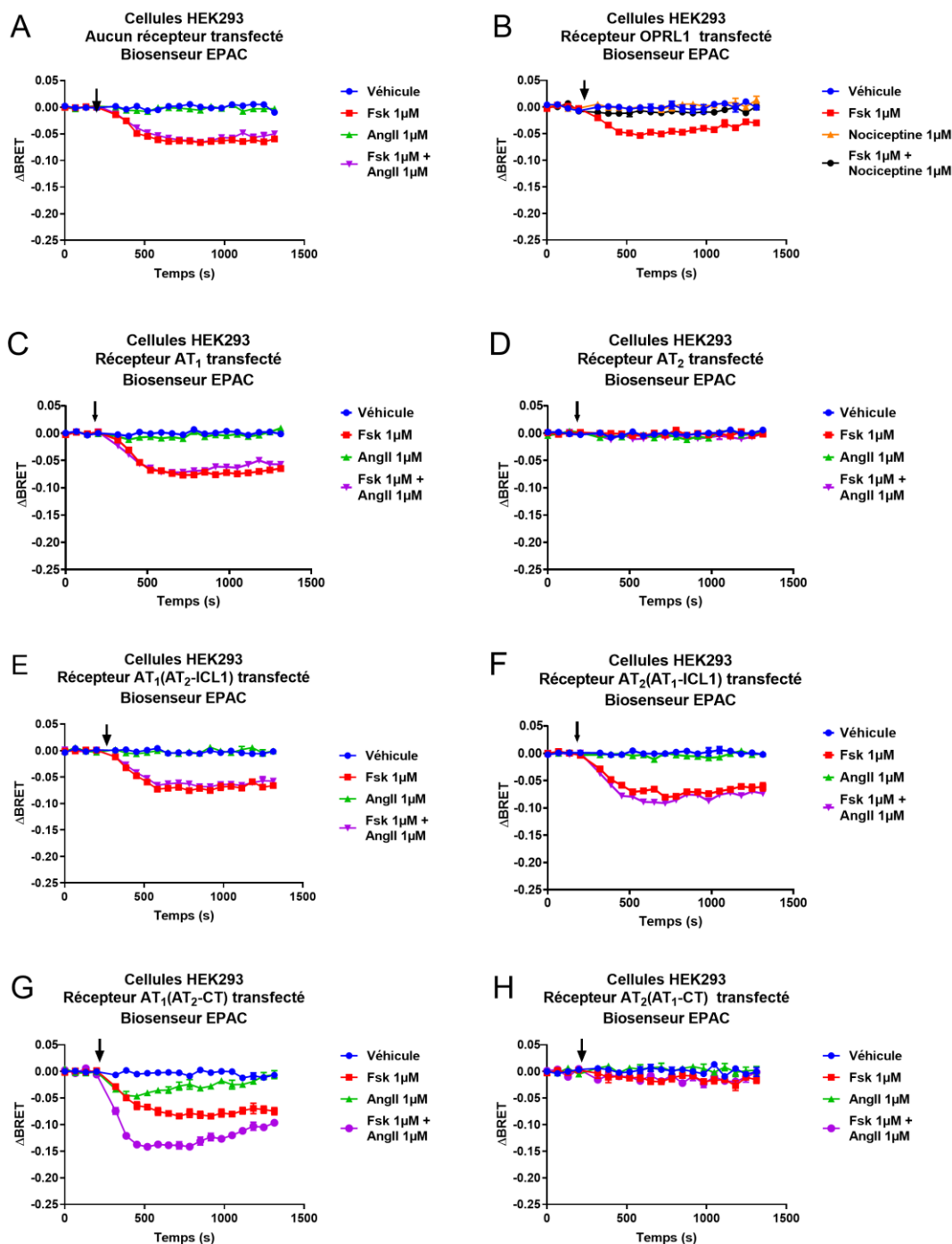


Figure 9. Évolution dans le temps de la production d'AMPc mesurée par BRET. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le récepteur OPR11 (B), AT₁ (C), AT₁(AT₂-ICL1) (E), AT₁(AT₂-CT) (G), AT₂ (D), AT₂(AT₁-ICL1) (F), AT₂(AT₁-CT) (H) ou Mock (A) et le biosenseur EPAC. La stimulation est indiquée par la flèche noire. Le changement du ratio de BRET témoigne du changement de la concentration intracellulaire en AMPc : une baisse de ratio témoigne d'une hausse de la concentration en AMPc intracellulaire. Chaque ensemble de données est exprimé par la moyenne \pm S.E.M et est fait en triplicata.

5.3 Différenciation des cellules NG108-15 induite par le récepteur AT₂

Les expériences menées jusqu'à maintenant n'ont pas permis d'associer au récepteur AT₂ de type-sauvage un effet ligand-dépendant. Dans le but de valider que le récepteur AT₂ peut effectivement engendrer une signalisation de type ligand-dépendante, il a été choisi de travailler avec les cellules NG108-15, qui expriment nativement le récepteur AT₂, et de mesurer l'impact de sa stimulation sur un phénotype bien connu pour ce modèle cellulaire, l'élongation des neurites. Une cellule dont un neurite est plus long que le diamètre de la cellule était considéré comme étant en différenciation (Laflamme et Gallo-Payet, 1996). Pour les cellules NG108-15 ayant été exposées uniquement au véhicule (Figure 10 A), 16.4% d'entre elles possèdent un tel neurite. Lorsque les cellules sont stimulées avec le C21 100nM (Figure 10 B), ce nombre passe à 41.6%. La stimulation avec l'AngII augmente elle aussi la proportion de cellules différenciées à 32.2%. Toutefois, le PD123319 réduit l'effet des agonistes à des valeurs ne différant pas significativement de l'utilisation du véhicule seul avec des valeurs de 23.8% et 24.9% pour les costimulations C21+PD123319 (Figure 10 C) et AngII+PD123319 respectivement. La stimulation d'AT₂ chez les cellules NG108-15 induit, de façon significative, une élongation des neurites et cette élongation est prévenue en présence d'antagonistes (figure 10 D).

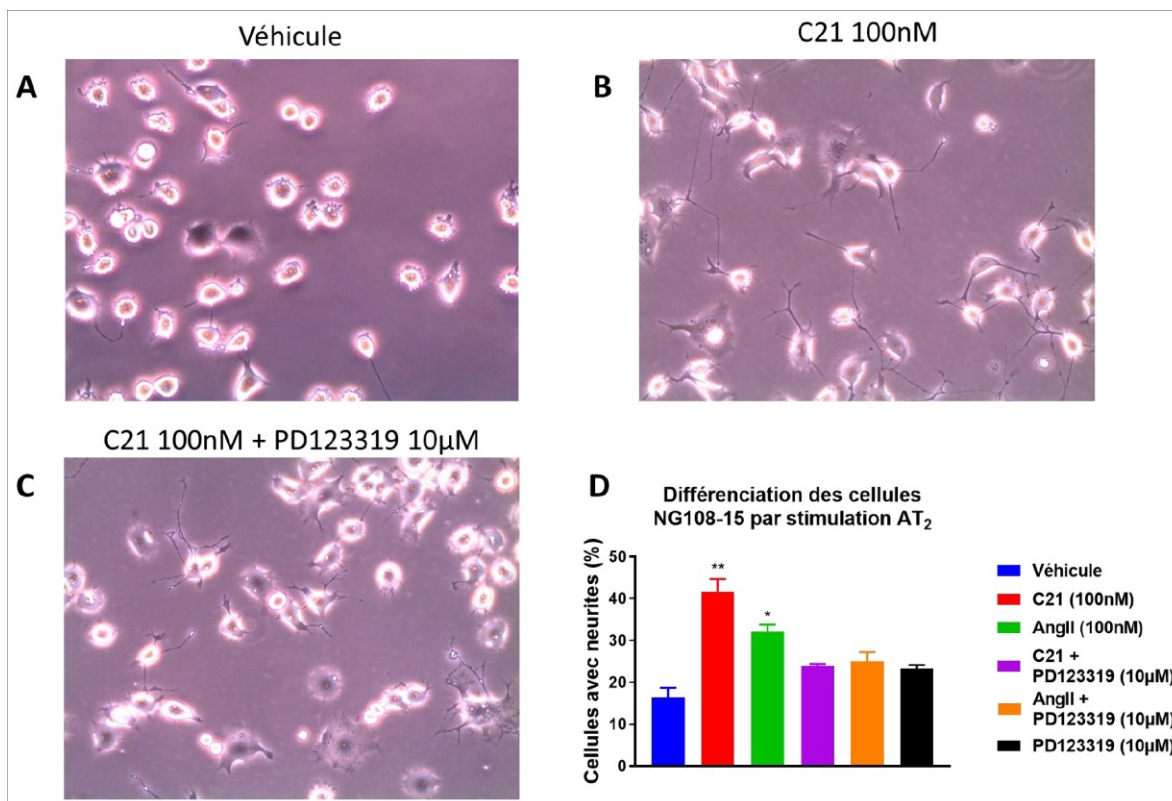


Figure 10. Effet de l'AngII et du C21 sur l'élongation des neurites dans les cellules NG108-15. Les cellules ont été cultivées pendant 72h avec (B) ou sans (A) stimulation (C21 100nM) et ce, en présence (C) ou non de PD123319 10μM (un antagoniste AT₂). La stimulation des cellules par les agonistes AT₂ induisent une différenciation cellulaire caractérisée par l'élongation des neurites. Une cellule dont un neurite est plus long que le diamètre de la cellule est considérée comme étant en différenciation (D). Les résultats représentent les valeurs obtenues dans 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

5.4 Analyse des effets d'AT₂ sur le phosphoprotéome

Ce projet visait à caractériser les modifications du phosphoprotéome induites par l'activation du récepteur AT₂ à la suite d'une stimulation par l'AngII (100nM) d'une durée de 5 minutes. Afin d'étudier le phosphoprotéome et les changements induits par cette stimulation du récepteur AT₂ dans les cellules HEK293, des analyses LC-MS/MS suivies d'une quantification label-free des peptides phosphorylés ont été réalisées. À la suite de ces analyses, environ 3700 phosphopeptides ont été identifiés avec le logiciel MaxQuant. Le logiciel Skyline a ensuite été utilisé pour la quantification et a permis de faire ressortir quatorze phosphopeptides dont la phosphorylation a significativement ($\alpha = 0.05$) été modifiée et dont la fonction pourrait être d'intérêt en ce qui a trait à la signalisation du récepteur AT₂. La modulation de la phosphorylation à la suite du traitement à l'AngII était toujours positive, avec comme seule exception la protéine issue du gène FGD1 qui a vu ces niveaux de phosphorylation diminués. Les résultats sont présentés dans la Figure 11 et détaillés dans le Tableau 1. Le rôle et l'implication de chacun de ces gènes seront vus plus en détail dans la section suivante.

Modification du phosphoprotéome par la stimulation du récepteur AT₂ dans les cellules HEK293

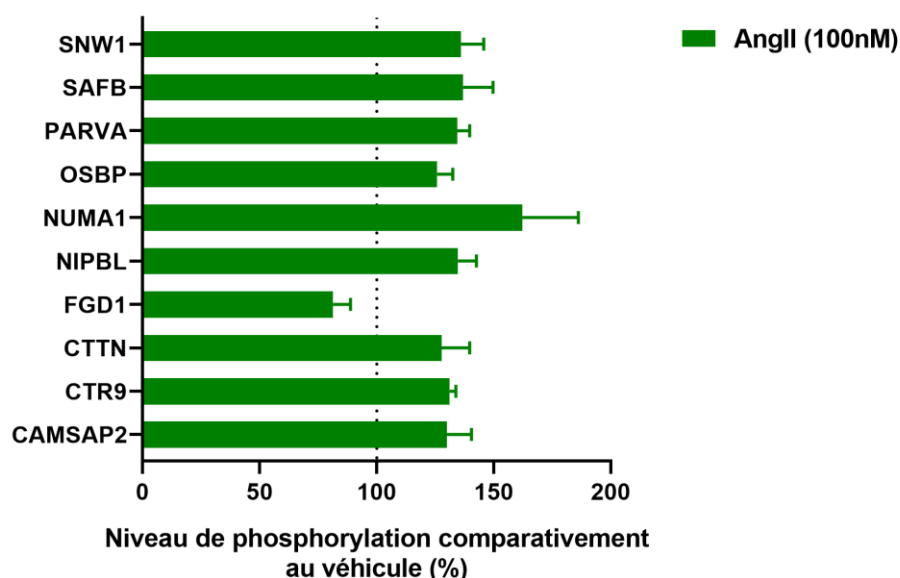


Figure 11. Analyse des différences au niveau du phosphoprotéome de cellules HEK293 transfectées avec le récepteur AT₂ à la suite d'une stimulation de 5 minutes avec 100nM d'AngII comparativement au véhicule seul. Les résultats représentent les changements des niveaux de phosphorylation obtenus dans 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

Gène	Séquence peptidique phosphorylée	Student's T-test	p
CAMSAP2	SIS[+80]NEGLTLNNSHVSK	0,37	0,0408
CTR9	RKGS[+80]GS[+80]EQEGEDEEGGER	0,44	0,0017
	RKGS[+80]GS[+80]EQEGEDEEGGER	0,34	0,0042
CTTN	TQT[+80]PPVS[+80]PAPQPT[+80]EERLPSPVYEDAASFK	0,34	0,0393
	TQT[+80]PPVS[+80]PAPQPTTEERLPS[+80]SPVYEDAASFK	0,34	0,0393
FGD1	SLS[+80]LDPGQSLEPHPEGPQR	-0,31	0,0352
NIPBL	NNTAAET[+80]EDDES[+80]DGEDRGGGTSGSLRR	0,43	0,0126
NUMA1	LGS[+80]PDYGNSALLSLPGYRPTTR	0,66	0,0340
OSBP	MLAES[+80]DES[+80]GDEESVSQTDKTELQNTLR	0,33	0,0189
PARVA	SPSVPKS[+80]PTPKS[+80]PPSR	0,46	0,0012
	SPSVPKS[+80]PT[+80]PKSPPSR	0,41	0,0026
	SPS[+80]VPKSPTPKS[+80]PPSR	0,41	0,0026
SAFB	SVVS[+80]FDKVKEPR	0,44	0,0126
SNW1	GPPS[+80]PPAPVMHS[+80]PSRK	0,44	0,0110

Tableau 1. Analyse des différences au niveau du phosphoprotéome de cellules HEK293 transfectées avec le récepteur AT₂ à la suite d'une stimulation de 5 minutes avec 100nM d'AngII comparativement au véhicule seul. Les sites de phosphorylation sont identifiés par le [+80]. Les résultats représentent les valeurs obtenues dans 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

DISCUSSION

6.1 Caractérisation de la signalisation du récepteur AT₂

Deux caractéristiques importantes sont mises en lumière lorsque l'on regarde l'ensemble des résultats traitant de la signalisation du récepteur AT₂.

6.1.1 Le récepteur AT₂ et la signalisation ligand-dépendante.

La première caractéristique importante mise en lumière est qu'AT₂ ne présente aucune signalisation ligand-dépendante détectable par BRET sous les conditions expérimentales utilisées. En effet, une stimulation par l'AngII (ou le C21) dans des cellules surexprimant le récepteur AT₂, ainsi que l'un des biosenseurs pour les voies de signalisation Gα_q, Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_{oA}, Gα_{oB}, Gα_z, Gα₁₂, Gα₁₃, β-arrestine1 ou β-arrestine2 n'induit aucune modulation (positive ou négative) des voies étudiées. Il est aussi important de mentionner que des essais de BRET ont aussi été effectués dans les cellules NG108-15, mais encore une fois, sous ces conditions expérimentales, le récepteur AT₂ n'induisait aucune activation ligand-dépendante des biosenseurs. Toutefois, bien que nous n'ayons pas pu détecter d'effets ligand-dépendant avec les biosenseurs BRET de la part du récepteur AT₂, certains effets exhibés par AT₂ semblent être ligand-dépendant. En effet, utilisant les cellules NG108-15 (Figure 10), il nous a été possible de démontrer que la stimulation du récepteur AT₂ induit une différenciation cellulaire. De plus, les travaux antérieurs de notre groupe ont permis de démontrer qu'un traitement ciblant le récepteur AT₂ était en mesure de normaliser bon nombre des phénotypes délétères associés au syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) chez des rats modèles de cette pathologie (Leblanc *et al.*, 2014).

Afin de concilier l'absence de réponse ligand-dépendante du récepteur AT₂ observé lors des essais BRET (Figures 5-8) et les effets étant associés à sa stimulation dans nos travaux, ainsi que dans la littérature, il est nécessaire de tenir compte de ce que chaque méthode observe. Par exemple, dans le cas des essais de différenciation cellulaire avec les NG108-15 (Figure 10), uniquement les changements phénotypiques sont observés. L'activation de diverses phosphatases, ainsi que la production de second messagers comme le GMPc ou le NO est aussi rapporté dans la littérature (de Gasparo *et al.*, 2000). Toutefois,

les premiers mécanismes de transduction de signal ayant lieu directement au récepteur n'ont jamais été élucidés pour AT₂. Ceci était notre objectif en utilisant les biosenseurs BRET, une technique capable de mesurer l'activation d'un GPCR par la dissociation du complexe hétérotrimérique couplant directement au récepteur. Nos résultats négatifs se sont toutefois avérés être d'une grande utilité dans la compréhension du récepteur AT₂ à la suite de la publication de sa structure en 2017. Nous y reviendrons dans la section 6.2.

6.1.2 Le récepteur AT₂ et la signalisation ligand-indépendante

La deuxième caractéristique importante mise en lumière est qu'AT₂ présente une forte activité constitutive. En effet, l'expression du récepteur AT₂ empêche complètement l'augmentation de la concentration d'AMPc dans la cellule à la suite d'une stimulation avec la forskoline (Figure 9 D). Cet effet est comparable à celui obtenu lors de la stimulation d'un récepteur capable d'activer la voie Gα_i, comme le récepteur OPRL1 stimulé avec la nociceptine par exemple. Ce résultat est d'autant plus intéressant sachant que seules les protéines Gα_{i2} et Gα_{i3} ont, à ce jour, été démontrées comme étant capables de coupler au récepteur AT₂ (J. Zhang et Pratt, 1996). Malgré le fait que nous sommes, au meilleur de notre connaissance, les premiers à démontrer que le récepteur AT₂ est en mesure de moduler les niveaux d'AMPc intracellulaire, il est bien connu que le récepteur AT₂ peut démontrer une activité constitutive. En effet, dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, la simple augmentation de l'expression du récepteur AT₂ induit l'apoptose (S Miura et Karnik, 2000). De plus, comme décrit dans la section 1.3.2.2, ainsi que dans l'article intégré au présent document, la structure du récepteur AT₂ est dans une conformation possédant plusieurs caractéristiques d'un récepteur actif. Il serait donc intéressant de proposer qu'une partie des effets du récepteur AT₂ puisse être contrôlée, non pas par la présence ou non d'un ligand, mais bien par le changement de ses niveaux d'expression. Une étude plus approfondie serait toutefois nécessaire afin de découvrir si ce type de contrôle de l'activité, par la modulation de l'expression du récepteur AT₂, pourrait être la raison pour laquelle il y a une augmentation drastique de l'expression d'AT₂ dans des circonstances pathologiques telles que l'hypertrophie cardiaque, l'infarctus du myocarde, la cardiomyopathie et l'insuffisance cardiaque (de Gasparo *et al.*, 2000).

6.2 Les déterminants structuraux importants et leurs implications dans la signalisation d'AT₂

6.2.1 Implication de la première boucle intracellulaire d'AT₂

Comme mentionné dans l'introduction et dans l'article à la section 3, la conformation d'AT₂ présente plusieurs caractéristiques structurales singulières. Dans cette section, il sera question d'une part de la cause du positionnement atypique de l'hélice 8, mais aussi des implications que cette position atypique a pour l'activité constitutive du récepteur. En simple rappel, l'encombrement stérique produit par l'hélice 8 placée dans la cavité servant de pochette de liaison pour les protéines G, entrave le couplage des protéines G ou des β -arrestines au récepteur AT₂ et contribue à la stabilisation du récepteur AT₂ dans une conformation active (H. Zhang *et al.*, 2017). Toutefois, la littérature n'offrait pas d'explications à savoir pourquoi l'hélice 8 était positionnée ainsi. Nous avons émis l'hypothèse que la composition de l'ICL1 serait le facteur sous-jacent à ce positionnement atypique de l'hélice 8 chez AT₂.

En ce sens, la substitution de l'ICL1 d'AT₂ avec celle d'AT₁ a eu plusieurs effets sur les propriétés signalétiques du récepteur. En effet, le récepteur chimérique AT₁(AT₂-ICL1) présente diminution de l'ensemble de sa signalisation et même une perte totale de l'activation de la voie G_q comparativement à AT₁. Cette absence de la signalisation G_q, pouvant initialement sembler contradictoire avec la production, quoique fortement réduite, d'IP₁. Toutefois, comme proposé dans l'article à la section 3, il est possible que la production d'IP₁ mesuré à la suite de la stimulation de la chimère AT₁(AT₂-ICL1) provienne d'une activation de la PLC par un dimère G $\beta\gamma$ d'une voie de signalisation autre que G_q (Smrcka, 2008). Une première étape pour vérifier ceci pourrait être de faire une immunoprécipitation de PLC suivi d'un immunobuvardage pour le dimère G $\beta\gamma$ avec et sans stimulation du récepteur.

Cependant, l'une des conséquences les plus importantes de la substitution de l'ICL1 d'AT₂ avec celle d'AT₁, est que la chimère AT₂(AT₁-ICL1) a été en mesure d'activer de façon ligand-dépendante la voie G_{i2} (Figure 3 B de l'article). De plus, d'autres effets ont aussi été mis en lumière lorsque nous avons étudié l'impact de la substitution de l'ICL1 sur l'activité constitutive du récepteur. Il a été possible de constater, en utilisant le biosenseur EPAC avec la chimère AT₂(AT₁-ICL1), que cette chimère avait perdu toute l'activité

constitutive initialement présente avec la version sauvage d'AT₂ (Figure 9 F). En effet, la stimulation avec la Fsk (1 μ M) induit une baisse du ratio BRET similaire aux cellules sans récepteur surexprimé ou avec une surexpression du récepteur AT₁. Ceci est en accord avec notre hypothèse, ainsi qu'avec la littérature, puisque nos résultats suggèrent, qu'avec l'ICL1 du récepteur AT₁, l'éloignement de l'hélice 8 de la pochette de liaison des protéines G du côté intracellulaire du récepteur ne serait plus en mesure de stabiliser le récepteur dans une conformation active. En effet, la conformation active est stabilisée en interagissant avec les résidus Phe325^(8.50), Leu329^(8.54), Val332^(8.57), Phe333^{8.58}, Arg324^(8.49), Gln326^(8.51) et Lys328^(8.53) des TM 3, 5 et 7. L'ICL1 n'avait donc pas comme seule conséquence d'entraver le recrutement et l'activation de protéines G, mais avait potentiellement comme rôle de conférer au récepteur AT₂ son activité constitutive.

6.2.2 Rôle et implication de l'hélice 8 d'AT₂

Comme mentionné dans l'introduction et dans l'article, la conformation d'AT₂ présente plusieurs caractéristiques structurales singulières. Celle dont il sera question dans cette section est l'hélice 8. Ayant initialement été présenté comme étant la cause sous-jacente pour l'absence de recrutement de protéines G chez AT₂ suite à la découverte de la position atypique, nous avons maintenant démontré que l'absence de signalisation ligand-dépendante d'AT₂ n'est pas seulement une conséquence de la composition en acides aminés de l'hélice 8, mais aussi des résidus présents dans l'ICL1. Il ne faut toutefois pas sous-estimer l'importance et l'impact qu'elle peut avoir sur le profil signalétique. En effet, nos résultats (Figure 4 et Tableau 3 de l'article) démontrent que d'une part l'hélice 8 d'AT₂, lorsque placée dans le récepteur AT₁ (menant à la création de la chimère AT₁(AT₂-CT)), est compatible avec la signalisation G-protéine dépendante, allant même jusqu'à augmenter l'efficacité de l'AngII pour les voies de signalisation G₁₂ et G_{i2}. De plus, l'utilisation du biosenseur EPAC avec les chimères AT₁(AT₂-CT) et AT₂(AT₁-CT) a permis de mettre en lumière une autre implication importante de l'hélice 8. D'un côté, avec AT₂(AT₁-CT), le profil de réponse avec EPAC ne diffère pas significativement lorsqu'on le compare au récepteur AT₂ sauvage (Figure 9 D et H). En revanche, en comparant le profil de réponse EPAC du récepteur AT₁ et de la chimère AT₁(AT₂-CT) (Figure 9 C et G), il est possible de constater un changement important. À la suite de la stimulation avec l'AngII, la chimère AT₁(AT₂-CT) induit une hausse des niveaux d'AMPC intracellulaires dans les cellules HEK293. Certes, l'utilisation

du biosenseur EPAC ne nous permet pas de confirmer que la hausse d'AMPc induit par la chimère AT₁(AT₂-CT) est due à l'activation de la voie G_s. Il est donc intéressant de proposer que ce pourrait être le cas et que l'utilisation d'un biosenseur G_s pourrait confirmer (ou infirmer) cette idée. De plus, malgré le fait qu'une publication démontre l'activation, quoique faible, de la voie G_s par le récepteur AT₁ lorsque stimulé avec le [¹Sar⁴Ile⁸Ile]-angiotensine II (Saulière *et al.*, 2012), l'activation des voies G_q, G₁₂, et G_{i2} par le récepteur AT₁ dans nos travaux est en accord avec la grande majorité des articles traitant de ce sujet (de Gasparo *et al.*, 2000; Domazet *et al.*, 2015; Namkung *et al.*, 2018; St-Pierre *et al.*, 2018). L'hélice 8 dans la chimère AT₁(AT₂-CT) ne semble donc pas seulement affecter l'efficacité des voies G-protéine dépendantes, mais pourrait aussi avoir un rôle quant à la spécificité des voies de signalisation activées par le récepteur. Il a déjà été démontré que la substitution des ICL3, pour les récepteurs α_1 -adrenergique (α_1 AR) et β_2 -adrenergique (β_2 -AR), induit un changement dans la spécificité des voies activées (Cotecchia *et al.*, 1990). Toutefois, il serait intéressant d'explorer la possibilité que la queue C-terminale peut aussi changer, à elle seule, la spécificité de signalisation d'un GPCR.

Une hypothèse qui pourrait tenter de concilier l'ensemble des connaissances au sujet de la signalisation du récepteur AT₂ semblerait donc être possible. Il serait intéressant de proposer que le récepteur AT₂ puisse fonctionner de deux façons différentes. La première serait sous sa forme native, le récepteur AT₂ possède une forte activité constitutive et le changement de ses niveaux d'expression serait suffisant pour engendrer une signalisation ligand-indépendante. Ce pourrait être la raison pour laquelle son expression est aussi dynamique et qu'elle est réexprimée en cas de pathologie dans les tissus atteints. D'un autre côté, pour permettre une signalisation ligand-dépendante, le récepteur AT₂ aurait besoin d'un partenaire d'interaction, comme la protéine ATIP ou d'un autre partenaire toujours inconnu. De plus, la signalisation ligand-dépendante pourrait être permise par une modification post-traductionnel du récepteur AT₂. Par exemple, il pourrait s'agir d'une palmytoylation au niveau de la queue C-terminale qui pourrait forcer le déplacement de l'hélice 8 hors de la pochette de liaison des protéines G, un processus déjà connu comme pouvant réguler l'activité de certains GPCR (Goddard et Watts, 2012). En effet, une hausse des concentrations circulantes acides gras non estérifiés (AGNE), comme dans le contexte d'une

pathologie tel que le SOPK, pourrait être nécessaire à la modification du récepteur AT₂ et ainsi laisser place à son activation de façon ligand-dépendante. Toutefois, plus de travaux seront nécessaires pour tenter de comprendre comment fonctionne réellement le récepteur AT₂.

6.3 AT₂ et les effets de sa stimulation sur le phosphoprotéome cellulaire et son potentiel comme cible thérapeutique.

Comme mentionné précédemment, l'analyse des effets de la stimulation du récepteur AT₂ est un deuxième projet dont l'objectif était, dans un premier temps, d'identifier de nouvelles voies de signalisation activées par la stimulation du récepteur AT₂. La découverte de nouvelles voies de signalisation associées au récepteur AT₂ est d'autant plus importante puisque plusieurs évidences suggèrent que le récepteur AT₂ serait une cible prometteuse dans le traitement de pathologies comme le diabète et le SOPK. En bref, le SOPK est la maladie endocrinienne la plus fréquente chez les femmes en âge de procréer et la cause principale d'augmentation de production d'androgènes (hyperandrogénisme) et d'infertilité.

Le SOPK est défini par l'hyperandrogénisme et l'oligoanovulation, mais est aussi associé à plusieurs désordres métaboliques, incluant le diabète (Azziz *et al.*, 2009; Faubert *et al.*, 2016). Présentement, les traitements contrôlant à la fois les symptômes et les risques cardiométaboliques du SOPK sont peu efficaces (Baillargeon *et al.*, 2004; Faubert *et al.*, 2016). Il est donc impératif de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, afin de contrôler les conséquences sérieuses du SOPK. En ce sens, plusieurs évidences suggèrent qu'AT₂ est une cible intéressante pour améliorer à la fois la lipotoxicité et l'hyperandrogénisme du SOPK. En effet, 1) chez des rats avec diabète nutritionnel, l'utilisation du C21 diminue la résistance à l'insuline et autres paramètres de lipotoxicité (Shum *et al.*, 2013); 2) un traitement avec un antagoniste AT₁, laissant place à une activation AT₂, diminue l'hyperandrogénisme des femmes SOPK (Jensterle *et al.*, 2007); et 3) chez des rates obèses SOPK, un traitement de 7 jours avec le C21 normalise l'augmentation de la captation ovarienne en AGNE et des niveaux d'androgènes, en comparaison aux rates SOPK non traitées (Leblanc *et al.*, 2014).

L'analyse du phosphoprotéome est une méthode innovatrice permettant l'identification et la quantification de milliers de phosphopeptides uniques en un seul essai. Ainsi, l'analyse de la phosphorylation différentielle induite par l'activation d'AT₂ nous a permis d'identifier de nouveaux effecteurs associés à la stimulation d'AT₂ et dont certains pourraient nous aider à mieux comprendre l'implication d'AT₂ dans une pathologie comme le SOPK. Pour simplifier l'implication de ces résultats, ils ont été divisés en différents groupes. La première série de protéines qui seront présentées ont tous en commun au moins une fonction impliquant le cytosquelette. En effet, les protéines *Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 2* (CAMSAP2), *Src substrate cortactin* (CTTN) et *Nuclear mitotic apparatus protein 1* (NUMA1) sont tous principalement impliqués dans la modification de la morphologie cellulaire par une interaction avec le cytosquelette (Haren et Merdes, 2002; von Holleben *et al.*, 2011; Yau *et al.*, 2014). Il est aussi important de souligner que les protéines codées par CAMSAP2 et CTTN ont cette fonction dans les cellules neuronales. Il serait donc intéressant de voir si leurs activations sont impliquées dans l'élongation des neurites lors de la stimulation du récepteur AT₂ dans les cellules NG108-15. Quant à la protéine *PH domain-containing protein 1* (aussi connue sous les noms RhoGEF et FYVE) (FGD1), elle agit comme un facteur d'échange guanine-nucléotide spécifique à Cdc42Hs, joue un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine et est aussi impliquée dans la morphologie cellulaire (Zheng *et al.*, 1996). Finalement, *Alpha-parvin* (PARVA) est, quant à elle, principalement localisée aux adhérences focales et interagit avec des effecteurs comme la kinase testiculaire 1 (TESK-1), la kinase liée à l'intégrine (ILK), PKB/Akt ainsi qu'avec la paxilline pour ultimement médier ses effets sur la motilité, la propagation, l'adhérence et la survie cellulaire (Sepulveda et Wu, 2006). Il est aussi important de souligner qu'*Alpha-parvin* est aussi importante pour le développement de la vasculature au stade embryonnaire (Fraccaroli *et al.*, 2015). Formant la deuxième série de protéines identifiées lors de l'analyse du phosphoprotéome, les protéines *RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog* (CTR9) et *Nipped-B-like protein* (NIPB1) sont elles aussi, comme *Alpha-parvin*, impliquées dans le développement (Krantz *et al.*, 2004; K. Zhang *et al.*, 2013). Malgré le fait que les protéines présentées jusqu'à présent ne semblent pas être liées au SOPK elles sont certainement des avenues intéressantes dans la caractérisation des voies de signalisation du récepteur AT₂.

En revanche, les trois protéines composant la troisième et dernière série de protéines identifiées pourraient, quant à elles, être intéressantes dans un contexte de SOPK. La première, la *Oxysterol-binding protein 1* (OSBP), est un transporteur de lipides permettant le transfert des lipides entre le golgi et le réticulum endoplasmique, et d'induire une inhibition de la voie des ERK (Mesmin *et al.*, 2013; Olkkonen, 2015). La deuxième, la *Scaffold attachment factor B1* (SAFB1) peut agir comme corépresseur du récepteur à l'œstrogène et serait importante pour la fertilité des souris femelles (Ivanova *et al.*, 2005). La troisième, la *SNW domain-containing protein 1* (SNW1), est connue pour augmenter l'activité de transcription de récepteur à la vitamine D ligand-dépendante (Barry *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter qu'un autre projet de notre groupe dont les résultats ne sont pas encore publiés, intitulé «La vitamine D corrige la surproduction d'androgènes induite par les acides gras non estérifiés dans les cellules NCI-H295R», avait justement comme objectif de déterminer quels étaient les effets de la vitamine D sur la surproduction d'androgène dans le contexte de SOPK. De plus la *SNW domain-containing protein 1* est aussi en mesure de lier l'*Androgen receptor* et d'augmenter son activation par la 5 α -dihydrotestostérone (Abankwa *et al.*, 2013). Bien entendu, ces résultats nécessitent une validation par l'utilisation d'une seconde méthode, l'immunobuvardage par exemple. Il est tout de même important de souligner que l'utilisation de l'analyse du phosphoprotéome s'est avérée être prometteuse dans l'optique de trouver de nouvelles voies de signalisation associées à la stimulation d'un GPCR et pourrait s'avérer être un outil utile dans le futur.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de maîtrise, nous avons démontré que la cause sous-jacente du manque de signalisation canonique d'AT₂ serait due, non aux résidus composant l'hélice 8, mais plutôt aux résidus de son ICL1 ce qui mènerait à la conformation atypique observée de l'hélice 8 dans la structure AT₂. Globalement, nos résultats démontrent que l'ICL1 et la queue C-terminale d'AT₂ sont des déterminants structuraux importants et confèrent au récepteur AT₂ des caractéristiques uniques aux récepteurs chimériques dans lesquels ils sont substitués. Cela ouvre de nouvelles possibilités quant aux avenues possibles dans la poursuite d'une meilleure compréhension du récepteur AT₂ et de la signalisation des GPCR.

De plus, l'analyse des modifications du phosphoprotéome a permis de trouver de nouvelles voies de signalisation potentielles, et ce, dans le but d'élargir le potentiel thérapeutique du récepteur AT₂ et d'approfondir notre compréhension de sa signalisation. Le développement d'outils capables de nous donner une vue d'ensemble des conséquences issues d'une stimulation spécifique pourrait nous aider à mieux interpréter et contextualiser les effets et les voies de signalisation mis en lumière par les essais dirigés comme le BRET.

D'autre part, la publication de la structure du récepteur AT₂ s'est avérée être instrumentale dans nos travaux. Il est donc essentiel de continuer les travaux menant à la découverte de nouvelles structures de GPCR. Je suis d'avis qu'elles seront d'une grande utilité, non seulement pour l'étude des GPCR, mais aussi pour un vaste éventail de domaines. Il est aussi intéressant de noter que l'utilisation de techniques comme la simulation par dynamique moléculaire pourrait être d'une grande utilité dans un contexte comme celui d'AT₂ où l'on cherche à comprendre le rôle et l'implication que peut avoir chacune des différentes portions d'un GPCR.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abankwa, D., Millard, S. M., Martel, N., Choong, C. S., Yang, M., Butler, L. M., Buchanan, G., et al. (2013) Ski-interacting protein (SKIP) interacts with androgen receptor in the nucleus and modulates androgen-dependent transcription. *BMC Biochemistry*, 14(1), 10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-402.
- Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H. F., Futterweit, W., Janssen, O. E., et al. (2009) *The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertility and sterility* (Vol. 91).
- Baillargeon, J. P., Jakubowicz, D. J., Iuorno, M. J., Jakubowicz, S. et Nestler, J. E. (2004) Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertility and Sterility*, 82(4), 893-902.
- Barry, J. B., Leong, G. M., Church, W. B., Issa, L. L., Eisman, J. A. et Gardiner, E. M. (2003) Interactions of SKIP/NCoA-62, TFIIB, and Retinoid X Receptor with Vitamin D Receptor Helix H10 Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8224-8228.
- Bastien, N. R., Ciuffo, G. M., Saavedra, J. M. et Lambert, C. (1996) Angiotensin II receptor expression in the conduction system and arterial duct of neonatal and adult rat hearts. *Regulatory Peptides*, 63(1), 9-16.
- Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A. D. et Nahmias, C. (1997) Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *The Biochemical journal*, 325 (Pt 2(Pt 2), 449-54.
- Booz, G. W. et Baker, K. M. (1996) Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 28(4), 635-40.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. et Muñoz, J. M. (1940) The substance

- causing renal hypertension. *The Journal of physiology*, 98(3), 283-98.
- Bumpus, F. M., Schwarz, H. et Page, I. H. (1957) Synthesis and pharmacology of the octapeptide angiotonin. *Science (New York, N.Y.)*, 125(3253), 886-7.
- Cabana, J., Holleran, B., Beaulieu, M.-È., Leduc, R., Escher, E., Guillemette, G. et Lavigne, P. (2013) Critical hydrogen bond formation for activation of the angiotensin II type 1 receptor. *The Journal of biological chemistry*, 288(4), 2593-604.
- Côté, F., Laflamme, L., Payet, M. D. et Gallo-Payet, N. (1998) Nitric oxide, a new second messenger involved in the action of angiotensin II on neuronal differentiation of NG108-15 cells. *Endocrine Research*, 24(3-4), 403-407.
- Cotecchia, S., Exum, S., Caron, M. G. et Lefkowitz, R. J. (1990) Regions of the alpha 1-adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(8), 2896-900.
- Couzin, J. (2005) American Association for the Advancement of Science meeting. DNA tells story of heart drug failure. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5713), 1191.
- Cvacek, V., Goddard, W. A. et Abrol, R. (2016) Structure-Based Sequence Alignment of the Transmembrane Domains of All Human GPCRs: Phylogenetic, Structural and Functional Implications. (N. Ben-Tal, Dir.) *PLOS Computational Biology*, 12(3), e1004805.
- de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., Unger, T., Gasparo, M. D. E., Catt, K. J., et al. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, 52(3), 415-72.
- Deupi, X. et Kobilka, B. (2007) Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Advances in Protein Chemistry*, 74(07), 137-166.
- Domazet, I., Holleran, B. J., Richard, A., Vandenberghe, C., Lavigne, P., Escher, E., Leduc, R., et al. (2015) Characterization of Angiotensin II Molecular Determinants Involved in AT1 Receptor Functional Selectivity. *Molecular Pharmacology*, 87(6), 982-995.
- Dorsam, R. T. et Gutkind, J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(2), 79-94.
- Downes, G. B. et Gautam, N. (1999) The G Protein Subunit Gene Families. *Genomics*, 62(3), 544-552.

- Dupré, D. J., Robitaille, M., Rebois, R. V. et Hébert, T. E. (2008) The Role of G $\beta\gamma$ Subunits in the Organization, Assembly, and Function of GPCR Signaling Complexes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1), 31-56.
- Dzau, V. J. et Gibbons, G. H. (1987) Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *The American journal of cardiology*, 60(17), 99I-103I.
- Faubert, J., Battista, M.-C. et Baillargeon, J.-P. (2016) PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Insulin action and lipotoxicity in the development of polycystic ovary syndrome: A review. *Journal of animal science*, 94(5), 1803-1811.
- Fessart, D., Simaan, M. et Laporte, S. A. (2005) c-Src regulates clathrin adapter protein 2 interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(2), 491-503.
- Fillion, D., Cabana, J., Guillemette, G., Leduc, R., Lavigne, P. et Escher, E. (2013) Structure of the human angiotensin II type 1 (AT1) receptor bound to angiotensin II from multiple chemoselective photoprobe contacts reveals a unique peptide binding mode. *The Journal of biological chemistry*, 288(12), 8187-97.
- Fraccaroli, A., Pitter, B., Taha, A. A., Seebach, J., Huveneers, S., Kirsch, J., Casaroli-Marano, R. P., et al. (2015) Endothelial Alpha-Parvin Controls Integrity of Developing Vasculature and Is Required for Maintenance of Cell-Cell Junctions. *Circulation Research*, 117(1), 29-40.
- Fredriksson, R. et Schiöth, H. B. (2005) The Repertoire of G-Protein-Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1414-1425.
- Gallo-Payet, N., Shum, M., Baillargeon, J.-P., Langlois, M.-F., Wallinder, C., Alterman, M., Hallberg, A., et al. (2012) AT2 Receptor Agonists: Exploiting the Beneficial Arm of Ang II Signaling. *Current Hypertension Reviews*, 8(1), 47-59.
- Gendron, L., Côté, F., Payet, M. D., Gallo-Payet, N., Cote, F., Payet, M. D. et Gallo-Payet, N. (2002) Nitric oxide and cyclic GMP are involved in angiotensin II AT2 receptor effects on neurite outgrowth in NG108-15 cells. *Neuroendocrinology*, 75(1), 70-81.
- Gendron, L., Laflamme, L., Rivard, N., Asselin, C., Payet, M. D. et Gallo-Payet, N. (1999) Signals from the AT2 (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal

- differentiation in NG108-15 cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(9), 1615-26.
- George, S. R., O'Dowd, B. F. et Lee, S. P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 1(10), 808-20.
- Gether, U., Ballesteros, J. A., Seifert, R., Sanders-Bush, E., Weinstein, H. et Kobilka, B. K. (1997) Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility. *The Journal of biological chemistry*, 272(5), 2587-90.
- Goddard, A. D. et Watts, A. (2012) Regulation of G protein-coupled receptors by palmitoylation and cholesterol. *BMC biology*, 10, 27.
- Guimond, M.-O. et Gallo-Payet, N. (2012) The Angiotensin II Type 2 Receptor in Brain Functions: An Update. *International Journal of Hypertension*, 2012, 1-18.
- Haren, L. et Merdes, A. (2002) Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules. *Journal of cell science*, 115(Pt 9), 1815-24.
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H. B. et Gloriam, D. E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(12), 829-842.
- Henzler-Wildman, K. et Kern, D. (2007, décembre 13) Dynamic personalities of proteins. *Nature*.
- Higashijima, T., Ferguson, K. M., Sternweis, P. C., Smigel, M. D. et Gilman, A. G. (1987) Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *The Journal of biological chemistry*, 262(2), 762-6.
- Hilger, D., Masureel, M. et Kobilka, B. K. (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(1), 4-12.
- Hunyady, L. et Catt, K. J. (2005) Pleiotropic AT 1 Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Molecular Endocrinology*, 20(5), 953-970.
- Hurowitz, E. H., Melnyk, J. M., Chen, Y. J., Kouros-Mehr, H., Simon, M. I. et Shizuya, H. (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA research : an international journal for rapid publication of*

- reports on genes and genomes*, 7(2), 111-20.
- Ivanova, M., Dobrzycka, K. M., Jiang, S., Michaelis, K., Meyer, R., Kang, K., Adkins, B., et al. (2005) Scaffold attachment factor B1 functions in development, growth, and reproduction. *Molecular and cellular biology*, 25(8), 2995-3006.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M. et Seuwen, K. (2006, août 11) The 7TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Jensterle, M., Janez, A., Vrtovec, B., Meden-Vrtovec, H., Pfeifer, M., Prezelj, J. et Kocjan, T. (2007) Decreased androgen levels and improved menstrual pattern after angiotensin II receptor antagonist telmisartan treatment in four hypertensive patients with polycystic ovary syndrome: case series. *Croat.Med.J.*, 48(1332-8166 (Electronic)), 864-870.
- Karnik, S. S., Unal, H., Kemp, J. R., Tirupula, K. C., Eguchi, S., Vanderheyden, P. M. L. et Thomas, W. G. (2015) Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 754-819.
- Kaschina, E. et Unger, T. (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood pressure*, 12(2), 70-88.
- Khan, S. M., Sleno, R., Gora, S., Zylbergold, P., Laverdure, J.-P., Labbe, J.-C., Miller, G. J., et al. (2013) The Expanding Roles of G Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological Reviews*, 65(2), 545-577.
- Kobilka, B. K. (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(4), 794-807.
- Krantz, I. D., McCallum, J., DeScipio, C., Kaur, M., Gillis, L. A., Yaeger, D., Jukofsky, L., et al. (2004) Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of Drosophila melanogaster Nipped-B. *Nature Genetics*, 36(6), 631-635.
- Laflamme, L. et Gallo-Payet, N. (1996) Angiotensin II Induction of Neurite Outgrowth by AT2 Receptors in NG108-15 Cells. EFFECT COUNTERACTED BY THE AT1 RECEPTORS. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22729-22735.
- Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Clément, M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R. et Guillemette, G. (2005) Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *The Biochemical journal*, 390(Pt 1), 367-76.
- Latorraca, N. R., Venkatakrishnan, A. J. et Dror, R. O. (2017) GPCR Dynamics: Structures

- in Motion. *Chemical reviews*, 117(1), 139-155.
- Leblanc, S., Battista, M.-C., Noll, C., Hallberg, A., Gallo-Payet, N., Carpentier, A. C., Vine, D. F., et al. (2014) Angiotensin II Type 2 Receptor Stimulation Improves Fatty Acid Ovarian Uptake and Hyperandrogenemia in an Obese Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, 155(9), 3684-3693.
- Lefkowitz, R. J. et Shenoy, S. K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5721), 512-7.
- Lemarié, C. a, Schiffrin, E. L., Lemarie, C. A., Schiffrin, E. L., Lemarié, C. a et Schiffrin, E. L. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. , 11 JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System 19-31 (2010). Hypertension and Vascular Research Unit, Lady Davis Institute for Medical Research, Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, QC, Canada, Lady Davis Institute for Medical Research, Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish Gene.
- Li, J.-M., Mogi, M., Tsukuda, K., Tomochika, H., Iwanami, J., Min, L.-J., Nahmias, C., et al. (2007) Angiotensin II-Induced Neural Differentiation via Angiotensin II Type 2 (AT 2) Receptor-MMS2 Cascade Involving Interaction between AT 2 Receptor-Interacting Protein and Src Homology 2 Domain-Containing Protein-Tyrosine Phosphatase 1. *Molecular Endocrinology*, 21(2), 499-511.
- Marinissen, M. J. et Gutkind, J. S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*, 22(7), 368-76.
- McBee, J. K., Palczewski, K., Baehr, W. et Pepperberg, D. R. (2001) Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research*, 20(4), 469-529.
- Mehta, P. K. et Griendling, K. K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C82-C97.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G. et Antonny, B. (2013) A Four-Step Cycle Driven by PI(4)P Hydrolysis Directs Sterol/PI(4)P Exchange by the ER-Golgi Tether OSBP. *Cell*, 155(4), 830-843.
- Miura, S et Karnik, S. S. (2000) Ligand-independent signals from angiotensin II type 2

- receptor induce apoptosis. *The EMBO journal*, 19(15), 4026-4035.
- Miura, Shin-ichiro, Saku, K. et Karnik, S. S. (2003) Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 26(12), 937-43.
- Namkung, Y., LeGouill, C., Kumar, S., Cao, Y., Teixeira, L. B., Lukasheva, V., Giubilaro, J., et al. (2018) Functional selectivity profiling of the angiotensin II type 1 receptor using pathway-wide BRET signaling sensors. *Science Signaling*, 11(559), eaat1631.
- Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R. T., et al. (2011) Distinct phosphorylation sites on the β 2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science Signaling*, 4(185), ra51.
- Nouet, S. et Nahmias, C. (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11(1), 1-6.
- Ohyama, K., Yamano, Y., Sano, T., Nakagomi, Y., Hamakubo, T., Morishima, I. et Inagami, T. (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regulatory peptides*, 57(2), 141-7.
- Olkkonen, V. M. (2015) OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport Over Membrane Contact Sites. *Lipid insights*, 8(Suppl 1), 1-9.
- Olson, S., Oeckler, R., Li, X., Du, L., Traganos, F., Zhao, X. et Burke-Wolin, T. (2004) Angiotensin II stimulates nitric oxide production in pulmonary artery endothelium via the type 2 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(3), L559-68.
- Ovchinnikov, Y. A., Abdulaev, N. G. et Bogachuk, A. S. (1988) Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS Letters*, 230(1-2), 1-5.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., et al. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), 739-45.
- Pierce, K. L., Premont, R. T. et Lefkowitz, R. J. (2002, septembre 1) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group.
- Plouffe, B., Guimond, M. O., Beaudry, H. et Gallo-Payet, N. (2006) Role of tyrosine kinase receptors in angiotensin II AT2 receptor signaling: Involvement in neurite outgrowth

- and in p42/p44mapk activation in NG108-15 cells. *Endocrinology*, 147(10), 4646-4654.
- Ren, X.-R., Reiter, E., Ahn, S., Kim, J., Chen, W. et Lefkowitz, R. J. (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1448-53.
- Rhee, S. G. et Bae, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *The Journal of biological chemistry*, 272(24), 15045-8.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L. et Krans, H. M. (1971) The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action. *The Journal of biological chemistry*, 246(6), 1877-82.
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. et Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-63.
- Saulière, A., Bellot, M., Paris, H., Denis, C., Finana, F., Hansen, J. T., Altié, M.-F., et al. (2012) Deciphering biased-agonism complexity reveals a new active AT1 receptor entity. *Nature chemical biology*, 8(7), 622-30.
- Sepulveda, J. L. et Wu, C. (2006) The parvins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(1), 25-35.
- Shenoy, S. K. et Lefkowitz, R. J. (2005) Seven-Transmembrane Receptor Signaling Through -Arrestin. *Science Signaling*, 2005(308), cm10-cm10.
- Shum, M., Pinard, S., Guimond, M.-O., Labbé, S. M., Roberge, C., Baillargeon, J.-P., Langlois, M.-F., et al. (2013) Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304(2), E197-210.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. et Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5007), 802-8.
- Skeggs, L. T., Lentz, K. E., Kahn, J. R., Shumay, N. P. et Woods, K. R. (1956) The amino acid sequence of hypertensin. II. *The Journal of experimental medicine*, 104(2), 193-7.
- Smrcka, A. V (2008) G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(14), 2191-214.

- St-Pierre, D., Cabana, J., Holleran, B. J., Besserer-Offroy, É., Escher, E., Guillemette, G., Lavigne, P., et al. (2018) Angiotensin II cyclic analogs as tools to investigate AT1R biased signaling mechanisms. *Biochemical pharmacology*, 154, 104-117.
- Steckelings, U. M., Larhed, M., Hallberg, A., Widdop, R. E., Jones, E. S., Wallinder, C., Namsolleck, P., et al. (2011) Non-peptide AT2-receptor agonists. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(2), 187-192.
- Suzuki, N., Hajicek, N. et Kozasa, T. (2009) Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *NeuroSignals*.
- Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. et Huang, X.-Y. (2016) Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), 3850-68.
- Tigerstedt, R. et Bergman, P. Q. (1898) Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie*, 8(1), 223-271.
- Verdonk, K., Durik, M., Abd-Alla, N., Batenburg, W. W., Van Den Bogaerdt, A. J., Van Veghel, R., Roks, A. J. M., et al. (2012) Compound 21 induces vasorelaxation via an endothelium-and angiotensin II type 2 receptor-independent mechanism. *Hypertension*, 60(3), 722-729.
- von Holleben, M., Gohla, A., Janssen, K.-P., Iritani, B. M. et Beer-Hammer, S. (2011) Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (SLy2) regulates actin dynamics and B cell spreading. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 13489-501.
- Weis, W. I. et Kobilka, B. K. (2018) The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1), 897-919.
- Wettschureck, N. et Offermanns, S. (2005) Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159-1204.
- Wheatley, M. et Hawtin, S. R. (1999) Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role. *Human reproduction update*, 5(4), 356-64.
- Yau, K. W., van Beuningen, S. F. B., Cunha-Ferreira, I., Cloin, B. M. C., van Battum, E. Y., Will, L., Schätzle, P., et al. (2014) Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. *Neuron*, 82(5), 1058-1073.
- Zhang, H., Han, G. W., Batyuk, A., Ishchenko, A., White, K. L., Patel, N., Sadybekov, A.,

- et al. (2017) Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature*, 544(7650), 327-332.
- Zhang, J. et Pratt, R. E. (1996) The AT₂ receptor selectively associates with Gi_{1/2} and Gi₁₃ in the rat fetus. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15026-15033.
- Zhang, K., Haversat, J. M. et Mager, J. (2013) CTR9/PAF1c regulates molecular lineage identity, histone H3K36 trimethylation and genomic imprinting during preimplantation development. *Developmental Biology*, 383(1), 15-27.
- Zheng, Y., Fischer, D. J., Santos, M. F., Tigyi, G., Pasteris, N. G., Gorski, J. L. et Xu, Y. (1996) The Faciogenital Dysplasia Gene Product FGD1 Functions as a Cdc42Hs-specific Guanine-Nucleotide Exchange Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33169-33172.
- Zhu, M., Gelband, C. H., Moore, J. M., Posner, P. et Sumners, C. (1998) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A₂ and arachidonic acid. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(2), 679-86.

